

**Calciumphosphat-Nanopartikel als
Wirkstoffträger:
Kolloidchemie und biomedizinische
Anwendung**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

vorgelegt von
Johannes Rüsing
aus Essen

vorgelegt der Fakultät für Chemie
der Universität Duisburg-Essen

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom Dezember 2010 bis April 2014 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Matthias Epple am Institut für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 26.06.2014

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Matthias Epple

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Christian Mayer

Vorsitzende: Frau Prof. Dr. rer. nat. Karin Stachelscheid

Essen, den 11.04.2014

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretischer Teil	3
2.1	Nanopartikel	3
2.2	Stabilität von Nanopartikeln	5
2.3	Zeta-Potential	8
2.4	Calciumphosphat	10
2.5	Transfektion	11
2.6	Knochen	12
2.7	Knochenersatz	14
2.8	Bisphosphonate	15
3	Methoden	17
3.1	Dynamische Lichtstreuung	17
3.2	Rasterelektronenmikroskopie	20
3.2.1	Energiedispersive Röntgenfluoreszenz	20
3.3	Transmissionselektronenmikroskopie	21
3.4	Rasterkraftmikroskopie	21
3.5	Infrarotspektroskopie	23
3.6	UV/Vis-Spektroskopie	23
3.7	Fluoreszenzspektroskopie	24
3.8	Röntgenpulverdiffraktometrie	25
3.9	Thermogravimetrie	25
3.10	Elementaranalyse	26
3.11	Spezifische Oberfläche	27
3.12	MTT-Test	27
3.13	Transfektionsexperimente	28
4	Funktionalisierung von Ostim	31
4.1	Stabilisierung von Ostim mit kationischen Polymeren	31

4.1.1	Einleitung	31
4.1.2	Charakterisierung von unfunktionalisiertem Ostim	31
4.1.3	Stabilisierung von Ostim und Umladung mit DNA	32
4.1.4	Charakterisierung von Ostim	33
4.1.5	Ostim mit Polyallylaminhydrochlorid	35
4.1.6	Ostim mit Polyallylaminhydrochlorid ($M_W=56$ kDa)	42
4.1.7	Ostim mit linearem Polyethylenimin ($M_W=2$ kDa)	46
4.1.8	Ostim mit verzweigtem Polyethylenimin ($M_W=25$ kDa)	49
4.1.9	Stabilisierung von Ostim mit Polyethylenimin ($M_W=750$ kDa) . .	52
4.1.10	Stabilisierung von Ostim mit PDADMAC	54
4.1.11	Stabilisierung von Ostim mit Poly- α -Lysin	56
4.1.12	Stabilisierung von Ostim mit Poly- ϵ -Lysin	59
4.1.13	Transfektion mit DNA-dotiertem Calciumphosphat	62
4.1.14	Zusammenfassung	65
4.2	Ostim mit Siliciumdioxid	66
4.2.1	Einleitung	66
4.2.2	Experimenteller Teil	69
4.2.3	Ergebnisse und Diskussion	72
4.2.4	Zusammenfassung	87
4.3	Darstellung Safranin-markierter Partikel	88
4.3.1	Einleitung	88
4.3.2	Synthese	88
4.3.3	Charakterisierung	90
4.3.4	Zusammenfassung	94
5	Calciumphosphate und Polyplexe zur Transfektion	95
5.1	3-schalige Ostim-PEI-DNA-PEI Partikel und Polyplexe	95
5.1.1	Einleitung	95
5.1.2	Durchföhrung	96
5.1.3	Ergebnisse und Diskussion	97
5.1.4	Zusammenfassung	100
5.2	Polymerkapseln	101
5.2.1	Einleitung	101
5.2.2	Experimenteller Teil	103
5.2.2.1	Darstellung PAH-stabilsierter Calciumphosphatnanopartikel	103

5.2.2.2	Umladung der Partikel	104
5.2.2.3	Kapseldarstellung	104
5.2.2.4	Zellaufnahme	105
5.2.2.5	Genstummschaltung	106
5.2.2.6	Transfektion	106
5.2.3	Auswertung	107
5.2.3.1	Darstellung von Kapseln	107
5.2.3.2	Zellaufnahme	113
5.2.3.3	Genstummschaltung	118
5.2.3.4	Transfektion	121
5.2.4	Zusammenfassung und Diskussion	128
6	Knochenersatz	131
6.1	Alendronat-haltige Paste	131
6.1.1	Einleitung	131
6.1.2	Darstellung von Carboxymethylcellulose-stabilisierten Calciumphosphatnanopartikeln	133
6.1.3	Charakterisierung	135
6.1.4	Darstellung einer injizierbaren Paste	140
6.1.5	<i>Invitro</i> -Versuche	140
6.1.6	<i>invivo</i> -Versuche	143
6.1.7	Zusammenfassung	147
6.2	Transfizierende Paste	148
6.2.1	Einleitung	148
6.2.2	Darstellung der Matrix	149
6.2.3	Ergebnisse und Diskussion	150
6.2.4	Darstellung der transfizierenden Komponente	156
6.2.5	Zusammenfassung und Ausblick	158
7	Zusammenfassung	161
	Literaturverzeichnis	163
8	Anhang	179

1 Einleitung

Nanopartikel aus Gold sind bereits seit Jahrhunderten bekannt, um Glas zu färben. Die Nanotechnologie ist ein Forschungsschwerpunkt in vielen wissenschaftlichen Teildisziplinen. Nanomaterialien haben interessante Eigenschaften, die sich von denen der makroskopischen Materialien unterscheiden. In kosmetischen Produkten findet Titandioxid als UV-Absorber Anwendung. Nanopartikel aus Silber werden aufgrund ihrer antibakteriellen Wirkung ebenfalls in Kosmetika, aber auch in Textilien eingebaut. Neben den materialwissenschaftlichen Eigenschaften sind Nanomaterialien in den Biowissenschaften und der Medizin von hohem Interesse. Nanopartikel können aufgrund ihrer geringen Größe von Zellen aufgenommen werden. Hieraus resultieren toxikologische Fragestellungen. Daneben können Nanopartikel aber auch genutzt werden, um gezielt Wirkstoffe in Zellen zu transportieren.

Calciumphosphate eignen sich besonders gut als Wirkstoffträger in Zellen. Ihr Vorteil liegt in der Biodegradierbarkeit.

Diese Arbeit gliedert sich in drei Abschnitte. Im ersten Teil werden Ostimpartikel mit unterschiedlichen kommerziell erhältlichen kationischen Polymeren stabilisiert und anschließend charakterisiert. Bei Ostim handelt es sich um ein kommerziell erhältliches Knochenersatzmaterial aus nanoskopischem Hydroxylapatit. Zusätzlich wird die Eignung der unterschiedlich funktionalisierten Partikel als Träger für Nukleinsäuren für die Transfektion untersucht. Des Weiteren wird eine Funktionalisierung solcher Partikel mit Silicumdioxid diskutiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wird ein nanopartikuläres Trägersystem, das nach dem *Layer-by-Layer*-Verfahren hergestellt wird, synthetisiert und charakterisiert. Außerdem werden Hohlkapseln aus Nanopartikeln, auf die mit dem *Layer-by-Layer*-Verfahren Polymerschichten aufgebracht werden, durch Herauslösen des Kerns dargestellt.

Im dritten Teil der Arbeit geht es um konkrete Anwendungen zweier pastenartiger selbst dargestellter Formulierungen zur Unterstützung der Heilung von Knochenfrakturen. Die erste Formulierung enthält den aus der Osteoporose-Behandlung bekannten Wirkstoff Alendronsäure. Eine Neuigkeit des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Materials liegt in der guten Injizierbarkeit. Für diese Paste werden in Kooperation *in vivo* Versuche durchgeführt. Bei der zweiten Paste ist eine *in vivo* Untersuchung bereits genehmigt worden.

Hierbei geht es um die Entwicklung einer Paste auf der Basis von nanoskaligem Calciumphosphat, das mit DNA funktionalisiert werden kann.

2 Theoretischer Teil

2.1 Nanopartikel

Nach DÖRFLER handelt es sich bei Kolloiden um Partikel mit Teilchengrößen im Bereich von 1 nm bis 500 nm.^[1] Andere Definitionen geben als obere Grenze 1 μm an.^[2] Kolloidale Systeme bestehen aus einer dispergierten Phase und dem Dispergiermittel. Kolloid-disperse Systeme lassen sich nach STAUDINGER in die Klassen Dispersionskolloide, Assoziationskolloide und Molekülkolloide einteilen.^[1] Diese Klassen unterscheiden sich in ihren strukturellen und thermodynamischen Eigenschaften. Bei Molekülkolloiden handelt es sich um thermodynamisch stabile, einphasige Systeme, bei denen Makromoleküle in Lösung vorliegen. Sie bestehen aus $10^3 - 10^9$ kovalent verknüpften Atomen. Assoziationskolloide sind Mizellkolloide, die sich spontan und reversibel zusammenlagern. Es handelt sich um hydrophile, thermodynamisch stabile Systeme. Assoziationskolloide können einphasig oder zweiphasig sein. Dispersionskolloide sind zweiphasige Systeme. Es handelt sich um thermodynamisch instabile Systeme aus hydrophoben Kolloiden. Dispergierte Nanopartikel stellen kolloidale Lösungen dar. Die Aggregatzustände von den Kolloiden und dem Dispersionsmittel können fest, flüssig oder gasförmig sein. In Tabelle 2.1 sind unterschiedliche kolloid-disperse Systeme aufgelistet.

Der Begriff „Nano“ leitet sich vom griechischen $\nu\alpha\nu\omicron\varsigma$ (Zwerg) ab, die Vorsilbe „nano“

Tabelle 2.1: Kolloidale Systeme^[2]

System	dispergierte Phase	Dispersionsmittel
Dispersion	fest	flüssig
Aerosol	fest	gasförmig
Aerosol	flüssig	gasförmig
Schaum	gasförmig	flüssig
Schaum	gasförmig	fest
Emulsion	flüssig	flüssig

auf der metrischen Skala bedeutet 10^{-9} . Dies macht deutlich, dass es sich um für das menschliche Auge nicht erkennbar kleine Abmessungen handelt.^[3]

Nanopartikel haben eine im Vergleich zum Volumen sehr große Oberfläche. Sie weisen zum

Teil ungewöhnliche elektrische, optische und katalytische Eigenschaften auf.^[4] Die Eigenschaften werden durch die Zusammensetzung, die Größe und die Form der Nanostrukturen bestimmt.^[3]

Der Begriff Nanomaterial ist nicht einheitlich definiert, so dass es eine Vielzahl von Definitionen für Nanopartikel oder Nanomaterialien gibt. Nach neueren Definitionen werden Nanomaterialien als Materialien mit einer Längenausdehnung von 1 nm - 100 nm in mindestens einer Raumrichtung definiert. Hierbei wird zwischen Nanoplättchen, Nanofasern und Nanopartikeln unterschieden. Nanofasern werden nach ihren Eigenschaften weiter unterteilt. Eine Einteilung von Nanoobjekten nach DIN SPEC 1121:2010-02 ist in Abbildung 2.1 dargestellt. In polydispersen Systemen ist es wichtig, welcher Anteil der Partikel unter die

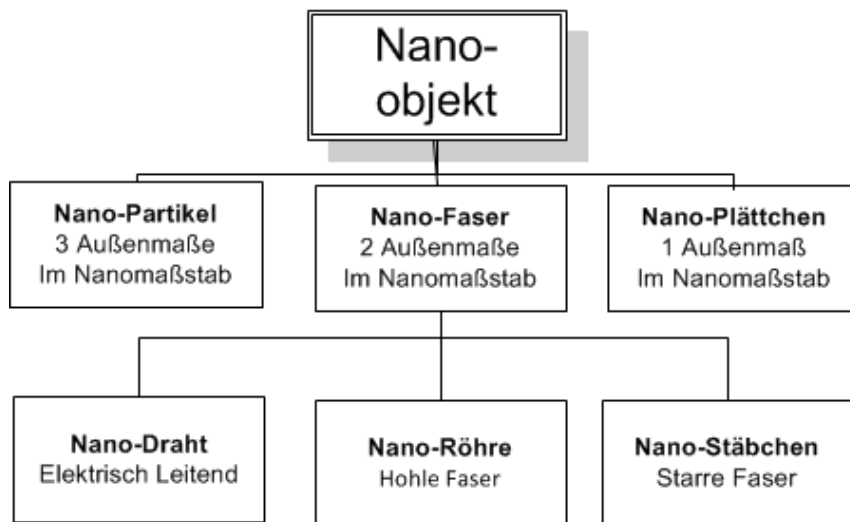


Abbildung 2.1: Einteilung nanoskopischer Materialien.^[5]

oben genannte Definition für ein Nanomaterial fällt. So gelten seit Mitte 2013 Regeln für die Kennzeichnung von Nanoobjekten in Kosmetika.^[6] Bei der Diskussion der Längenausdehnung ist der hydrodynamische Radius oder STOKES-Radius vom Kern-Radius zu unterscheiden. Während der hydrodynamische Radius mit Lichtstreuungsmethoden ermittelt werden kann, erhält man mit elektronenmikroskopischen Methoden den Kern-Radius. Eine weitere Problematik bei der Beurteilung von Größenverteilungen besteht in der unterschiedlichen Gewichtung der gemessenen Fraktionen. Je nach Methode wird eine anzahl-, streulicht-intensitäts- oder volumen-gewichtete Größenverteilung angegeben. Eine Umrechnung ist nur begrenzt möglich, so dass mit unterschiedlichen Methoden gemessene Systeme nur eingeschränkt vergleichbar sind. Für die regulatorische Beurteilung haben sich anzahl-gewichtete Messverfahren durchgesetzt. So gilt in der europäischen Union ein Material als Nanomaterial, wenn mindestens 50 % der Partikel in der anzahl-gewichteten Größenver-

teilung in mindestens einem Außenmaß eine Größe zwischen 1 nm und 100 nm aufweisen.^[7]

2.2 Stabilität von Nanopartikeln

Bei Dispersionskolloiden handelt es sich thermodynamisch instabile Systeme. Aufgrund ihrer geringen Größe haben Kolloide eine deutliche größere Oberfläche im Verhältnis zu ihrem Volumen als makroskopische Festkörper. Die freie Energie ΔG ist proportional zu der Oberfläche A . Diese hohe Oberflächenenergie von Nanopartikeln kann durch die Aggregation minimiert werden. Neben den anziehenden Kräften gibt es abstoßende Kräfte, die auf elektrostatische oder sterische Wechselwirkungen zwischen den dispergierten Teilchen zurückgeführt werden können. Sind die abstoßenden Kräfte stärker als die anziehenden Kräfte, ist das System in einem metastabilen Zustand.

Zur Beschreibung der Stabilität kann die DLVO-Theorie herangezogen werden. Sie wurde von DERJAGIN und LANDAU entwickelt und von VERWEY und OVERBEEK ausgearbeitet. Die DLVO-Theorie beschreibt attraktive und repulsive Wechselwirkungen zwischen Kolloiden. In der Theorie wird von geladenen Teilchen ausgegangen. Die Teilchen sind von einer elektrochemischen Doppelschicht umgeben. Zwischen den geladenen Teilchen kommt es mit abnehmendem Abstand zu einer steigenden Abstoßung. Neben der Abstoßung kommt es zur Anziehung. Die Anziehung ist auf VAN-DER-WAALS-Kräfte zurückzuführen. Durch Addition von abstoßender und anziehender Kraft erhält man eine resultierende Gesamtkraft. In Abbildung 2.2 sind Energie-Abstandskurven dargestellt. In Abbildung A ist eine hohe Energiebarriere P als Folge einer starken Abstoßung dargestellt. Damit zwei Partikel agglomerieren, muss diese Energie überwunden werden. In Abbildung B ist ein System mit einer verringerten Abstoßung dargestellt. Hierdurch kann das System in das primäre Energieminimum M_1 abgesenkt werden. Abbildung C zeigt ein nicht-stabilisiertes System. In diesem System ist keine Energiebarriere vorhanden, so dass es ohne Aufbringen einer Aktivierungsenergie in das Minimum fällt. In Abbildung D ist ein teilweise agglomeriertes System dargestellt. Bei einem abnehmendem Abstand H durchlaufen die Partikel ein sekundäres Energieminimum M_2 . Durchläuft das System dieses Minimum, so können kleine, schwach gebundene Aggregate entstehen. Diese weisen eine kurze Lebensdauer auf. Zum Aufbrechen der Aggregate eignet sich eine von außen zugeführte hydrodynamische Kraft, die man beispielsweise durch starkes Rühren erhält.^[8] Repulsive Kräfte können elektrostatisch und oder sterisch sein. Eine sterische Stabilisierung erreicht man durch Aufbringen von großen Liganden. Eine elektrostatische Stabilisierung wird durch geladene Liganden auf der Kolloidoberfläche erreicht. Eine Kombination aus elektrostatischer und sterischer

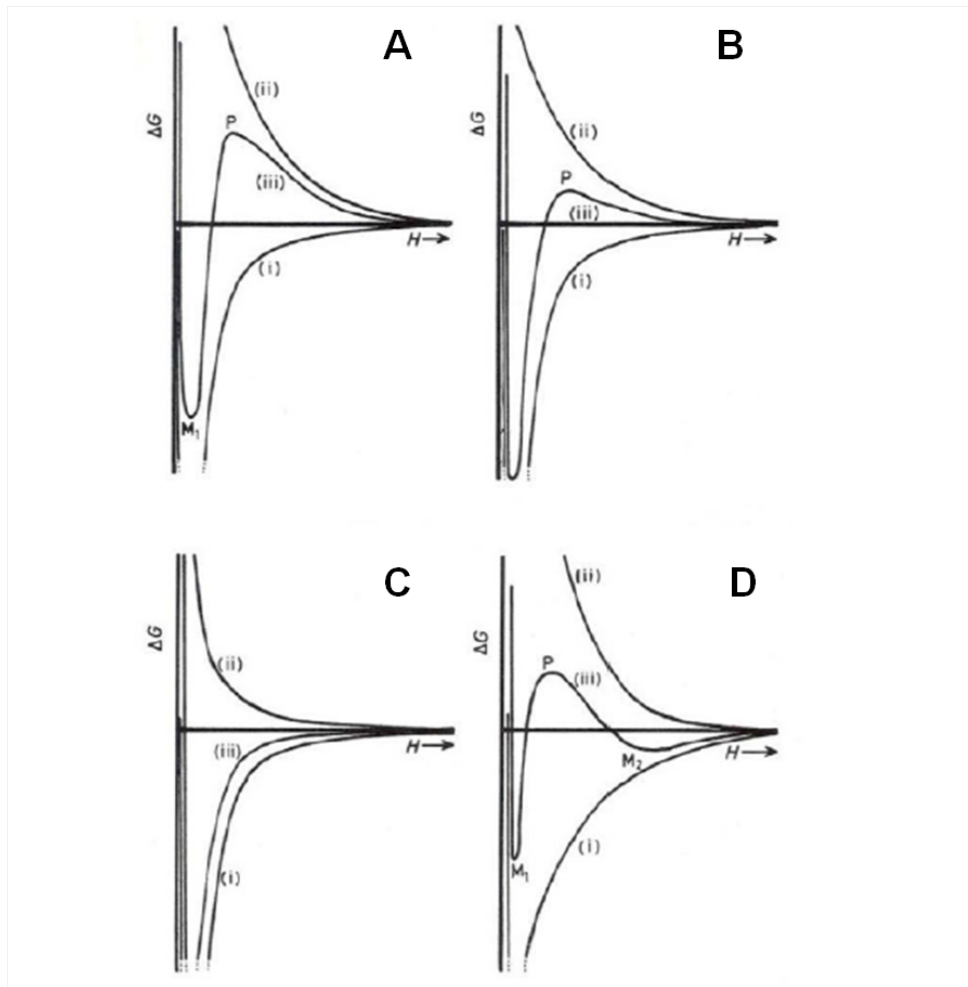


Abbildung 2.2: Energie-Abstand-Kurven der Wechselwirkungsenergie (iii) aus der Summe von anziehender (i) und abstoßender (ii) Energie.^[8]

Stabilisierung wird durch den Einsatz von Polyelektrolyten erreicht.^[9,10] In Abbildung 2.3 sind typische Energie-Abstandskurven für eine elektrostatische (A) Stabilisierung, die bereits diskutiert wurde, eine sterische (B) und eine elektrosterische Stabilisierung (C) dargestellt.^[9]

Einen wichtigen Einfluss auf die Stabilität von sterisch stabilisierten Nanopartikeln hat die Konzentration des stabilisierenden Polymers. Eine zu geringe Konzentration kann, wie auch eine zu hohe Konzentration, eine Destabilisierung des Systems bewirken. In Abbildung 2.4 ist dieser Zusammenhang schematisch dargestellt. Bei einer geringen Polymerkonzentration adsorbiert das Polymer an der Oberfläche von mehreren Partikeln, so dass es zu einer Aggregation kommt. Bei Erhöhung der Polymerkonzentration kommt es zu einer Stabilisierung der Partikel. Bei einer weiteren Erhöhung der Polymerkonzentration kommt es zu einer Verminderungsflockung und anschließend zu einer Verminderungsstabi-

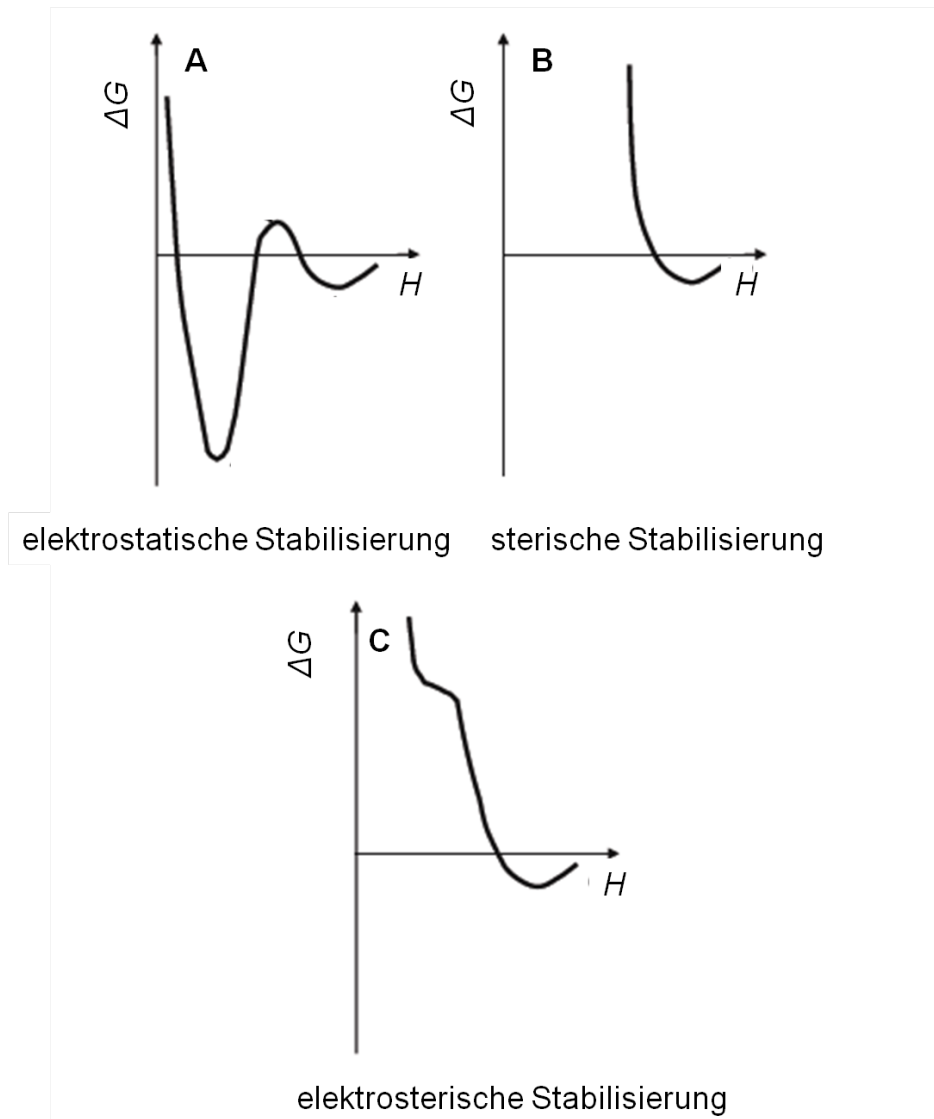


Abbildung 2.3: Elektrostatische (A), sterische (B) und elektrosterische (C) Stabilisierung von Nanopartikeln.^[9]

lisierung. Durch die sehr hohe Polymerkonzentration erhöht sich die Viskosität des Dispersionsmittels, so dass sich die Wahrscheinlichkeit für den Zusammenstoß von zwei Partikeln reduziert.

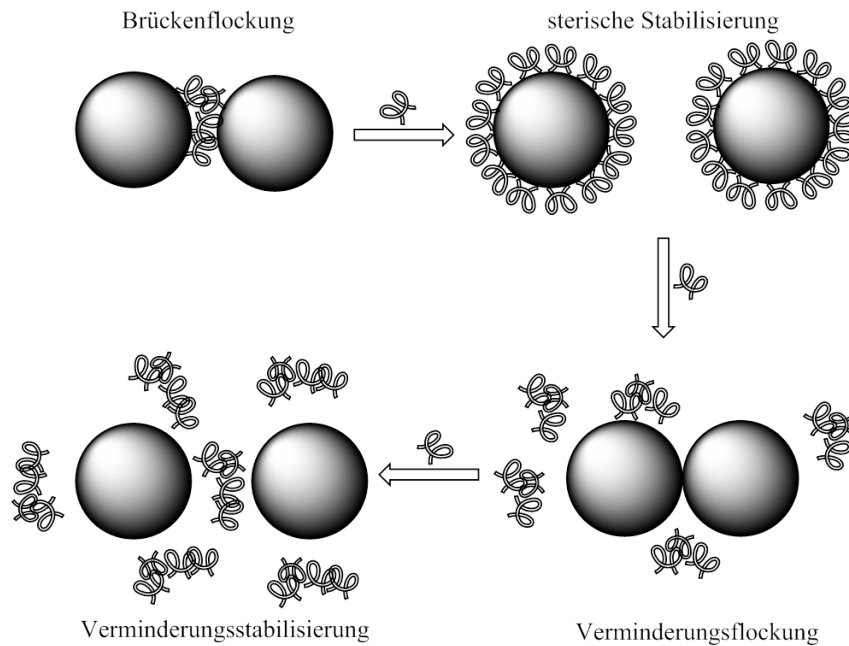


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Kolloidstabilität bei unterschiedlichen Polymerkonzentrationen.

2.3 Zeta-Potential

Die Stabilisierung von Kolloiden lässt sich quantitativ über das ζ -Potential beschreiben. Bei einem Partikel, das sterisch oder elektrosterisch stabilisiert wird, kommt es zur Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht an der Oberfläche. Auf der Partikeloberfläche befinden sich fest adsorbierte Ladungsträger. Diese Schicht wird als starre Schicht bezeichnet. An die starre Schicht schließt sich die diffuse Schicht an. Die Schichten sind in Abbildung 2.5 dargestellt. In der starren Schicht kommt es zu einem linearen Abfall des Potentials mit steigendem Abstand r . In der diffusen Schicht kommt es zu einem exponentiellen Abfall des elektrischen Potentials. Der Potentialverlauf ist in Abbildung 2.5 gezeigt. Das ζ -Potential wird durch die Bewegung des Partikels durch das Medium hervorgerufen. Bei einer Bewegung bewegt sich das Partikel mit der Stern-Schicht und einem Teil der diffusen Schicht. Das ζ -Potential wird als die Potentialdifferenz zwischen dem stationären und dem beweglichen Teil der elektrochemischen Doppelschicht definiert.^[1] Bei einem ζ -Potential von größer ± 30 mV können Kolloide als elektrostatisch stabilisiert angesehen werden.^[11]

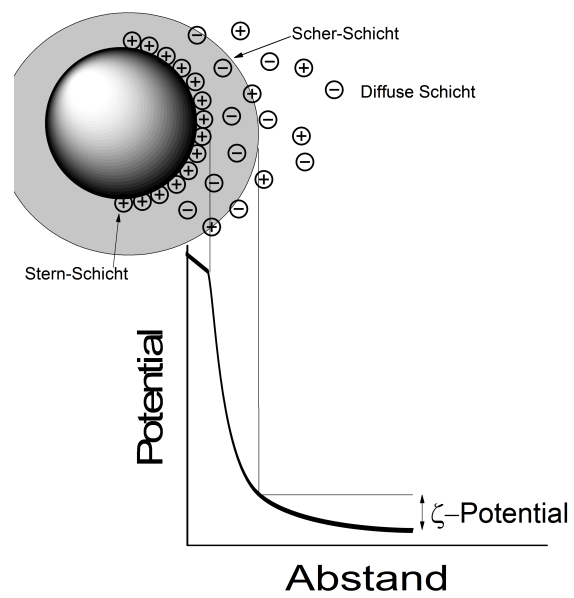


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung zur Erklärung des ζ -Potentials.

2.4 Calciumphosphat

Calciumphosphate sind eine weit verbreitete Stoffklasse, die sowohl biogen als auch geogen vorkommt. Das in Säugetieren wichtigste Biomineral ist das Calciumphosphat. Es dient zum Aufbau von Knochen und Zähnen.^[12]

Neben der biologischen Bedeutung spielen Calciumphosphate auch im technischen Bereich eine wichtige Rolle. Es gibt zahlreiche stöchiometrisch unterschiedliche Calciumphosphate. So ist Calciumdihydrogenphosphat, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, der Hauptbestandteil von Phosphatdüngern^[13], Tricalciumphosphat, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, ist als Lebensmittelzusatzstoff E 341 zugelassen und fungiert als Trennmittel, um die Rieselfähigkeit zu erhalten. Die maximal zulässige Konzentration nach Zusatzstoff-Zulassungsverordnung beträgt 1 mg kg^{-1} für Getreidekost.^[14] Strukturell lässt sich eine Einteilung in Ortho- (PO_4^{3-}), Pyro- ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) und Polyphosphat ($(\text{PO}_3)_n^{n-}$) treffen. Die Orthophosphate sind der Hauptbestandteil des menschlichen Hartgewebes (s. Kapitel 2.6).

Die Orthophosphorsäure H_3PO_4 weist drei Protonierungsstufen auf. So liegen abhängig vom pH-Wert Phosphat (PO_4^{3-}), Hydrogenphosphat (HPO_4^{2-}) oder Dihydrogenphosphat (H_2PO_4^-) vor. In jeder dieser Protonierungsstufen können durch den Zusatz von Calciumionen Calciumphosphate gebildet werden.

Eine wichtige Kenngröße für Calciumphosphate ist das molare Calcium-zu-Phosphor Verhältnis (Ca/P). Dieses reicht von 0,5 im Monocalciumphosphat-Monohydrat bis zu 2,0 im Tetracalciumphosphat, $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$. Allgemein weisen Calciumphosphate mit einem niedrigen Calcium-zu-Phosphor-Verhältnis eine höhere Wasserlöslichkeit als Calciumphosphate mit einem hohen Calcium-zu-Phosphor-Verhältnis auf.^[15] Alle Calciumphosphate sind im Sauren löslich. Monocalciumphosphat-Monohydrat hat eine so hohe Löslichkeit, dass es in biologischen Hartgeweben nicht vorkommt. Biologische Relevanz hat besonders der Hydroxylapatit, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. Sein Ca/P-Verhältnis beträgt 1,67, die Löslichkeit in Wasser bei 25°C beträgt $3 \cdot 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$.^[15] Dieser kommt in biologischen Systemen nicht phasenrein vor, sondern ist durch andere Ionen verunreinigt. Der calciumdefizitäre Hydroxylapatit entsteht bei Fällungsreaktionen von Calciumsalzlösungen und Phosphatlösungen in einem neutralen oder leicht alkalischen pH-Bereich. Durch das Vorhandensein von Hydrogenphosphationen können diese in den Kristall eingebaut werden. Die hierdurch resultierende überschüssige Ladung wird durch das Fehlen von Calciumionen ausgeglichen. Eine allgemeine Formel für calciumdefizitären Hydroxylapatit ist $\text{Ca}_{5-x}(\text{HPO}_4)_{2x}(\text{PO}_4)_{3-2x}\text{OH}$.

2.5 Transfektion

Das Einbringen von DNA fremden Ursprungs in Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Hierdurch kann die Proteinexpression der Zelle hochreguliert werden. Man unterscheidet die stabile und die transiente Transfektion. Bei der stabilen Transfektion wird die fremde DNA in das Genom der Zelle dauerhaft eingebaut. Bei der transienten Transfektion erfolgt kein Einbau in das Genom, das Zielprotein wird jedoch zeitlich begrenzt exprimiert.^[16]

Freie Nukleinsäuren können die Zellmembran nicht passieren, daher wird für den Transport ein geeigneter Vektor benötigt. Es lassen sich virale von nicht-viralen Vektoren unterscheiden. Zu den viralen Vektoren gehören Retroviren oder Adenoviren. Im November 2012 wurde erstmals mit Glybera[®] ein Medikament zur Gentherapie in der Europäischen Union zugelassen. Bei diesem Medikament zur Behandlung von Lipoproteinlipase-Defizienz dienen adeno-assoziierte Viren als Transporter.^[17–20] Die nicht-viralen Methoden lassen sich in physikalische und chemische Methoden einteilen. Zu den physikalischen Methoden gehören die Mikroinjektion, die Elektroporation und die *Gene Gun*. Bei der Mikroinjektion wird die zu übertragende DNA mit einer feinen Kapillare direkt in den Zellkern injiziert. Dies verhindert einen Abbau der DNA durch DNAsen, ist jedoch sehr aufwändig, da jede Zelle einzeln behandelt werden muss.^[21,22] Bei der Elektroporation wird eine Spannung angelegt. Dadurch wird die Zellmembran kurzfristig permeabel, so dass DNA eindringen kann.^[23,24] Bei der *Gene Gun* werden submikrometer-große Partikel mit DNA beschichtet und direkt auf die zu transfizierenden Zellen geschossen.^[25,26] Die Geschosspartikel bestehen meistens aus Gold und werden mit kationischen Polyelektrolyten beschichtet, um eine bessere DNA-Adsorption zu gewährleisten.^[27]

Zu den chemischen Methoden gehören die Calciumphosphat-Präzipitation, die Verwendung kationischer Polymere, die Transfektion mit Lipiden und die Verwendung von Nanopartikeln. Bei der Transfektion mit kationischen Polymeren macht man sich die elektrostatische Interaktion mit der anionischen DNA zunutze. Es lassen sich beispielsweise Polyplexe darstellen. Durch ihren kationischen Charakter können diese gut auf der negativ geladenen Zellmembran adsorbieren und durch Endozytose aufgenommen werden. Einen großen Einfluss auf die Transfektionseffizienz haben die Art des Polymers, aber auch seine molare Masse und der Verzweigungsgrad.^[28–32] Ein Nachteil der Transfektion mit kationischen Polymeren ist, dass diese zum Teil zytotoxisch sind.^[33] Bei der Transfektion mit Liposomen ist das Transfektionsreagenz Lipofectamin weit verbreitet. Dieses zeigt sehr hohe Transfektionsraten, ist jedoch in höheren Konzentrationen zytotoxisch.^[34–36]

Bei der Transfektion mit Nanopartikeln sind zahlreiche Materialien aus der Literatur bekannt. Es finden sich Untersuchungen zu Siliciumdioxid-Partikeln,^[37] Gold^[38,39], Magne-

tit^[40] und Calciumphosphat^[41–44].

Calciumphosphat hat den Vorteil, dass es im Säuren gelöst werden kann und die Ionen aus der Zelle heraus transportiert werden können.

Der Mechanismus der Transfektion mit DNA-beladenen Partikeln lässt sich in unterschiedliche Schritte einteilen. Als erstes müssen die Partikel auf der Zellmembran adsorbieren. Im nächsten Schritt erfolgt die Aufnahme der Partikel in die Zelle durch Endozytose. Im nächsten Schritt wird das Partikel aus dem Endosom freigesetzt und gelangt zum Zellkern.^[45,46] Die in die Zelle eingebrachte DNA kann in der Zelle enzymatisch abgebaut werden. Aus diesem Grund ist es wichtig, die DNA zu schützen.^[47] Dies kann beispielsweise durch die Verkapselung von DNA mit einem Polymer geschehen.

Wird die DNA in den Zellkern eingebracht, so kann sie von der RNA-Polymerase abgelesen und in mRNA (*messenger RNA*) transkribiert werden. Die mRNA wird durch die Kernporen des Zellkerns transportiert. Bei der Translation wird im Ribosom aus der mRNA eine Aminosäureabfolge für das Protein synthetisiert.

Bei der Genstummschaltung wird *small-interfering RNA* (siRNA) in Zellen eingebracht, um die Produktion bestimmter Proteine herabzusetzen.^[45]

2.6 Knochen

Knochen bildet den größten Anteil des Hartgewebes im Menschen. Das Skelett erfüllt dabei unterschiedlichste Funktionen. Zum Einen erfüllt es strukturelle Aufgaben, zum Anderen erfüllt es metabolische Aufgaben.

Zu den strukturellen Aufgaben des Knochen gehören ein Abstützen des Körpers gegen mechanische Kräfte und die Bildung eines Hebelsystems für Muskeln.

Eine weitere wichtige Funktion ist der Schutz innerer Organe wie beispielsweise des Gehirns durch die Schädelplatte oder der Lungen durch die Rippen. Abhängig von der strukturellen Aufgabe unterscheidet sich die makroskopische Knochenform. Sie lässt sich in Röhrenknochen, platte Knochen und pneumatisierte Knochen einteilen.^[48]

Eine wichtige metabolische Funktion ist die Speicherung von Calcium und Phosphat. Von dem im Körper vorkommenden Calcium sind etwa 99 %, von dem Phosphat etwa 75 % im Knochen gespeichert.^[49]

Knochen besteht aus Knochenzellen und Interzellulärsubstanzen. Die Interzellulärsubstanz stellt einen Verbundwerkstoff aus anorganischen und organischen Bestandteilen dar. Die anorganischen Bestandteile machen etwa 70 % des Knochens aus. Diese bestehen hauptsächlich aus Hydroxylapatit, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, in den Fremdionen wie zum Beispiel Carbo-

nat, Hydrogenphosphat, Magnesium oder Fluorid eingelagert sind.

Etwa 30 % des Knochens besteht aus organischen Materialien. Den größten Anteil macht hierbei das Kollagen vom Typ I aus. Die nicht-kollagenen Proteine wie zum Beispiel Osteocalcin und Osteonektin machen nur einen Anteil von etwa 5 % der organischen Knochen-substanz aus.^[50] Die Kollagenfasern führen zu einer Zugfestigkeit des Knochens, während das anorganische Material eine erhöhte Druckfestigkeit bewirkt.

Der Knochen ist anisotrop aufgebaut und lässt sich in die *Kompakta* und die *Spongiosa* einteilen. Die *Kompakta* ist sehr dicht aufgebaut, während die *Spongiosa* aus einem dünneren trabekulären Gewebe aufgebaut ist. An sie schließt sich das Knochenmark an, das im Inneren des Knochens liegt. Nach außen hin wird der Knochen durch das *Periost* begrenzt. Dieses besteht aus einer äußeren kollagenreichen Bindegewebsschicht und einer inneren zellreichen Schicht.

Der Knochenaufbau lässt sich durch unterschiedliche Hierarchie-Ebenen beschreiben. Als kleinste Baueinheit können mineralisierte Kollagenfibrillen angesehen werden. Diese bestehen aus helikal geordneten Kollagenmolekülen. In den Zwischenräumen ist Hydroxylapatit mit einer plättchenförmigen Morphologie angeordnet. Die nächsthöhere Hierarchie-Ebene stellt eine dreidimensionale Verknüpfung der Kollagenfibrillen zu Netzwerken dar. Die nächste Ordnungsstufe wird durch die Zellen, die im Knochen sind, bestimmt.^[12]

Die wichtigsten Zellen sind Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten. Der Knochen unterliegt einem ständigen Auf- und Abbau durch Osteoblasten und Osteoklasten.^[51] Bei Osteoblasten handelt es sich um etwa 10 µm große mesenchymale Zellen. Sie sind für den Knochenaufbau verantwortlich.

Die für den Knochenabbau verantwortlichen Osteoklasten sind vielkernige Riesenzellen, die mit einer Größe von 100 µm deutlich größer sind als Osteoblasten oder Osteozyten. Osteoklasten haben üblicherweise unter 10 Kerne, können jedoch bei pathologischen Veränderungen mehr als 100 Kerne aufweisen. Bei Osteoklasten handelt es sich um mobile Zellen. Nachdem eine Resorptionslakune gebildet wurde, bewegen sie sich zu einer anderen Stelle des Knochens, wo sie erneut eine Lakune erzeugen. Während der Bewegung sind Osteoklasten nicht resorptionsaktiv.^[50] Weiterhin kann eine Einteilung, abhängig von der Entstehung, in Lamellen- und Geflechtknochen vorgenommen werden. Der hierarchische Aufbau des Knochens führt zu einer Anisotropie der mechanischen Stabilität. Wird der Knochen überdehnt, so kommt es zu einer Fraktur.

2.7 Knochenersatz

Knochenersatzmaterialien können nach ihrem Ursprung in biologischen oder synthetischen Knochenersatz eingeteilt werden. Knochenersatzmaterialien biologischen Ursprungs lassen sich noch weiter in autogene, allogene und xenogene Materialien einteilen.^[48]

Unter autogenem Knochenersatzmaterial versteht man patienteneigenen Knochenersatz. Dieser wird beispielsweise aus dem Beckenkamm entnommen und in einen Defekt eingesetzt. Autogener Knochenersatz gilt als goldener Standard unter den Knochenersatzmaterialien.^[52] Ein Nachteil besteht in der Schwächung der mechanischen Stabilität an der Entnahme-Stelle und auftretenden Schmerzen.^[53]

Allogener Knochenersatz beschreibt Material, das fremden menschlichen Ursprungs ist. Dieser erwies sich als problematisch, da es zu unerwünschten Infektionserkrankungen kam. Ein weiterer Nachteil besteht in dem kostenintensiven Betrieb von Knochenbanken.^[48]

Bei xenogenem Knochenersatz handelt es sich um Material tierischen Ursprungs.^[12]

Neben der Einteilung nach der Herkunft gibt es andere Einteilungen, wie zum Beispiel nach der Vitalität, der biologischen Wertigkeit oder der Zusammensetzung.^[54] Bei der Einteilung nach der Zusammensetzung nimmt RUEGER eine Einteilung in die Klassen *biologisch*, *organische Substanzen*, *synthetisch-anorganische Materialien*, *synthetisch-organische Verbindungen* und *Komposite* vor.^[55]

Die *biologisch-organischen* Substanzen wurden früher aus Knochen extrahiert und werden heutzutage gentechnisch hergestellt.^[48] Bei den *synthetisch-anorganischen* Materialien nehmen Calciumphosphate eine wichtige Stellung ein. So sind beispielsweise β -Tricalciumphosphat unter dem Markennamen Cerasorb oder Hydroxylapatit unter der Bezeichnung Ostim in Verwendung.^[53,56] In die dritte Gruppe fallen organische Verbindungen, die nicht *in-vivo* im Knochen vorkommen, wie z.B. synthetische Polymere. *Komposite* erhält man durch die Kombination unterschiedlicher Knochenersatzmaterialien oder die Kombination mit einem nicht vorbehandelten biologischen Material.^[48] Hierbei muss unterschieden werden, ob es sich um die Kombination unterschiedlicher Materialien zur Verbesserung von mechanischen Eigenschaften oder um Biokomposite handelt, bei denen osteokonduktive Materialien mit Wachstumsfaktoren kombiniert werden.^[54]

An Knochenersatzmaterialien werden viele Anforderungen gestellt. So darf das Material nicht toxisch, kanzerogen oder antigen sein. Es sollte degradierbar und osteokonduktiv sein, um ein vollständiges Nachwachsen des Knochens zu ermöglichen. Unter Osteokonduktion versteht man einen Leitschieneneffekt, der ein gerichtetes Knochenwachstum entlang des Ersatzes ermöglicht. Weiterhin muss es je nach Applikationsort eine ausreichende mechanische Stabilität aufweisen. Zusätzliche Anforderungen sind eine Sterilisierbarkeit des Ma-

terials, um das Infektionsrisiko zu reduzieren, eine kostengünstige Produktion sowie eine gute Lagerfähigkeit. Wird das Knochenwachstum stimuliert, spricht man von Osteoinduktion. Die Osteoinduktion kann durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren *growth and differentiation factors* (GDF) oder die *bone morphogenetic proteins* (BMP) erzielt werden.^[57–59] Die *bone morphogenetic proteins* zeichnen sich gegenüber anderen Faktoren dadurch aus, dass sie eine Knochenneubildung durch die Transformation nicht-osteogener Zellen auslösen können.^[57] Die osteogene Wirkung der BMPs konnte in Experimenten gezeigt werden.^[58]

2.8 Bisphosphonate

Bisphosphonate können als synthetische Analoga des Pyrophosphates angesehen werden, in denen die P-O-P Teilstruktur durch eine P-C-P Struktur ersetzt wurde (Abbildung 2.6).^[60]

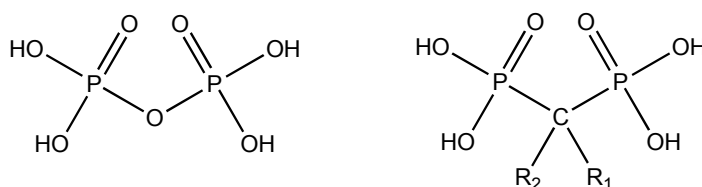


Abbildung 2.6: Strukturformeln von Pyrophosphat (links) und Bisphosphonat (rechts)

Im Gegensatz zu der instabilen P-O-P-Bindung ist die P-C-P Struktur bei sauren Bedingungen hydrolysebeständiger. Erstmals wurde 1895 von MENSCHUTKIN eine Synthese für „acetypyrophosphorige Säure“ aus Phosphorsäure und Chloracetyl vorgestellt.^[61,62]

Durch Substitution der beiden Wasserstoffatome am Kohlenstoffatom mit unterschiedlichen Resten R_1 und R_2 läßt sich eine Vielzahl von Bisphosphonaten darstellen.

Abhängig von den Substituenten R_2 lassen sich die Bisphosphonate in die vier Gruppen *Bisphosphonate ohne Stickstoffsubstitution (I)*, *Amino-Bisphosphonate (II)*, *am Stickstoff substituierte Amino-Bisphosphonate (III)* und *Bisphosphonate mit stickstoffhaltigen Heterocyclen (IV)* einteilen.^[63] In Tabelle 2.2 sind Bisphosphonate mit unterschiedlichen Seitenketten aufgeführt.

Die Anwendungsgebiete von Bisphosphonaten sind sehr vielfältig, wie sich beispielsweise an der Verwendung als Korrosionsschutz, zum Imprägnieren von Stoffen, dem Enthärten

Tabelle 2.2: Bisphosphonate mit unterschiedlichen Seitenketten.^[64,65]

Name	R_1	R_2
Etidronat	-OH	-CH ₃
Clodronat	-Cl	-Cl
Pamidronat	-OH	-(CH ₂) ₂ NH ₂
Alendronat	-OH	-(CH ₂) ₃ NH ₂
Risedronat	-OH	-CH ₂ -3-Pyridin
Tiludronat	-H	-CH ₂ -S-Phenyl-Cl
Zoledronat	-OH	-CH ₂ -Imidazol

von Wasser oder als Kunstdünger-Komponente zeigt.^[66] Die wichtigste Anwendung für Bisphosphonate ist der medizinische Bereich. Bisphosphonate haben eine hohe Affinität zum Calciumphosphat des Knochens, ein Großteil des resorbierten Bisphosphonates wird an der Knochenoberfläche abgelagert.^[63]

Die Resorption von Bisphosphonaten im Körper ist aufgrund ihrer geringen Lipophilie schlecht.^[67] Abhängig von den Resten R_1 und R_2 liegt sie zwischen unter 1 % und 5 %.^[68] Bisphosphonate haben zwei grundlegende biologische Effekte: zum Einen wird die Calcification bei der Gabe von hohen Dosen inhibiert. Zum Anderen kommt es zur Inhibition der Knochenresorption. Ursache hierfür ist die metabolisch stabile P–C–P-Bindung.^[62]

3 Methoden

3.1 Dynamische Lichtstreuung

Bei der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS, engl. *photon correlation spectroscopy*) bzw. der dynamischen Lichtstreuung (DLS, engl. *dynamic light scattering*) handelt es sich um ein dynamisches Streulichtverfahren, mit dem Teilchengrößen von etwa 5 nm bis 5 μm detektiert werden können. Neben der mittleren Teilchengröße lässt sich mit dieser Methode auch der Polydispersitätsindex (PDI) bestimmen.

Mit einem Laser wird Licht in die Dispersion gestrahlt. Dieses wird an den Nanopartikeln gestreut. In einem festen Winkel erfolgt die Detektion des Streulichtes. Da die Partikel der BROWN'schen Molekularbewegung unterliegen, kommt es zu einer Schwankung der Intensität I zwischen dem Startzeitpunkt t und der Verzögerungszeit τ .

Für die Zeitanalyse wird die Autokorrelationsfunktion $G_2(\tau)$ mit der Gleichung

$$G_2(\tau) = \langle I(t) \cdot I(t \pm \tau) \rangle \quad (3.1)$$

bestimmt. Die spitzen Klammern bezeichnen den Mittelwert für viele Messungen mit unterschiedlichen Anfangszeitpunkten t . Wegen der Mittelwertbildung ist die Autokorrelationsfunktion nur abhängig von der Verzögerungszeit τ , eine Abhängigkeit von der Startzeit t besteht nicht. Liegen sehr viele Partikel in Dispersion vor, so kann die Autokorrelationsfunktion näherungsweise als Exponentialfunktion mit der Gleichung

$$G_2(\tau) = A [1 + B \exp(-2\Gamma\tau)] \quad (3.2)$$

beschrieben werden. A ist die Basislinie der Korrelationsfunktion, B ist der Achsenabschnitt der Funktion. Γ ist die Abklingrate. Sie ist definiert als

$$\Gamma = Dq^2. \quad (3.3)$$

D ist der Diffusionskoeffizient für kugelförmige Partikel, q ist der Betrag des Streulichtvektors \vec{q} . Dieser ist definiert als die Vektordifferenz zwischen dem einfallenden \vec{k}_i und dem

gestreuten Wellenvektor \vec{k}_o

$$\vec{q} = \vec{k}_s - \vec{k}_i. \quad (3.4)$$

q ist proportional zum Brechungsindex des Dispersionsmediums n , dem Sinus des Winkels zwischen den Vektoren \vec{k}_s und \vec{k}_i und umgekehrt proportional zur Wellenlänge λ_0 des Lasers:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2}\right). \quad (3.5)$$

In polydispersen Systemen, wie sie in der Realität vorliegen, gilt

$$G_2(\tau) = A \left[1 + B g_1^2(\tau) \right]. \quad (3.6)$$

Wenn $G(\Gamma)$ die Verteilungsfunktion der Abklingrate Γ ist mit der Normierungsbedingung

$$\int_0^\infty G(\Gamma) d\Gamma = 1, \quad (3.7)$$

dann ist $G(\Gamma) d\Gamma$ proportional zum Anteil der Streulichtintensität der Partikel mit Abklingraten zwischen Γ und $\Gamma + d\Gamma$.

Für den Betrag der Feldkorrelationsfunktion $g_1(\tau)$ gilt

$$g_1(\tau) = \int_0^\infty G(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma. \quad (3.8)$$

Bei der Partikelgrößenbestimmung mittels dynamischer Lichtstreuung wird davon ausgegangen, dass alle Partikel die gleiche Form und Zusammensetzung haben und sich nur in der Größe unterscheiden.

Die mittlere Abklingrate $\langle\Gamma\rangle$ ist durch

$$\langle\Gamma\rangle = \int_0^\infty \Gamma G(\Gamma) d\Gamma \quad (3.9)$$

gegeben. Das Quadrat der Standardabweichung μ_2 ist

$$\mu_2 = \int_0^\infty (\Gamma - \langle\Gamma\rangle)^2 G(\Gamma) d\Gamma. \quad (3.10)$$

Aus der mittleren Abklingrate und dem Quadrat der Standardabweichung wird der Polydispersitätsindex PDI durch die Gleichung

$$PDI = \frac{\mu_2}{\langle \Gamma \rangle^2} \quad (3.11)$$

berechnet. Falls die Abklingraten mit den Parametern $\langle \Gamma \rangle$ und σ normalverteilt sind, d.h.

$$G(\Gamma) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \cdot \exp \left[-\frac{(\Gamma - \langle \Gamma \rangle)^2}{2\sigma^2} \right] \quad (3.12)$$

gilt

$$PDI = \frac{\mu_2}{\langle \Gamma \rangle^2} = \frac{\sigma^2}{2 \langle \Gamma \rangle^2}. \quad (3.13)$$

Mit der DLS wird nicht die Partikelgröße, sondern der Diffusionskoeffizient D bestimmt. Der hydrodynamische Radius R_H kann nur bestimmt werden, indem er zum Diffusionskoeffizienten ins Verhältnis gesetzt wird.^[69] Für kugelförmige Partikel gilt die STOKES-EINSTEIN-Gleichung

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H}. \quad (3.14)$$

k_B ist die BOLTZMANN-Konstante, T die absolute Temperatur und η die Viskosität. Für nicht-kugelförmige Partikel wird ein Durchmesser angegeben, der dem eines runden Partikels mit der gleichen Diffusion entspricht.^[69]

Das ζ -Potential ζ wird über die elektrophoretische Mobilität U_E bestimmt. Den Zusammenhang liefert die HENRY-Gleichung. Es gilt:

$$U_E = \frac{2\zeta f(\kappa R_H)\epsilon}{3\eta}. \quad (3.15)$$

ϵ ist die Dielektrizitätskonstante, η die Viskosität des Dispersionsmittels, R_H der Teilchenradius und κ die Dicke der elektrischen Doppelschicht. Für Teilchen größer 20 nm und Elektrolytkonzentrationen c kleiner $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ist die SMULUCHOWSKI-Näherung

$$U_E = \frac{\epsilon\zeta}{\eta} \quad (3.16)$$

anwendbar.^[1]

3.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) ist eine Methode zur direkten Abbildung von Oberflächen oder Nanopartikeln.^[1] Mit der Rasterelektronenmikroskopie kann eine laterale Auflösung von 2 nm erreicht werden.^[70]

Bei der Rasterelektronenmikroskopie wird ein Elektronenstrahl auf eine Probe fokussiert. Die Fokussierung erfolgt mit Hilfe von elektromagnetischen Feldern, die durch Spulen oder Kondensatoren erzeugt werden. Die Elektronen werden in Glühwendeln emittiert und auf bis zu 40 keV beschleunigt. Die Oberfläche der Probe wird mit dem Elektronenstrahl abgerastert. Um Wechselwirkungen der Elektronen mit Luftmolekülen, die eine verringerte Fokussierung und damit geringere Auflösung zur Folge hätten, zu reduzieren, erfolgt die Messung im Hochvakuum.^[70,71]

Beim Auftreffen der Elektronen auf die Probenoberfläche können unterschiedliche Prozesse auftreten. Ein Teil der auftreffenden Elektronen wird zurückgestreut und als Rückstreu-elektronen detektiert. Werden Elektronen der Probe beim Auftreffen des Elektronenstrahls emittiert, so spricht man von Sekundärelektronen.^[72]

Die Ausbeute an Sekundärelektronen ist von der Probenmorphologie abhängig. Dies führt zu einem Hell-Dunkel-Bild, das einen Tiefeneindruck der Probenoberfläche vermittelt.^[1]

Damit die Probe Sekundärelektronen emittieren kann, muss sie möglichst gut elektrisch leitend sein. Eine elektrisch schlecht leitende Probe wird durch den Elektronenbeschuss negativ aufgeladen. Die elektrische Leitfähigkeit wird jedoch durch Bedampfen mit einem elektrisch gut leitenden Stoff erhöht. Aus einem Argonplasma wird der leitende Stoff auf die Probe abgeschieden. Gut geeignet ist Gold. Durch den Zusatz von Palladium wird das Inselwachstum beim Bedampfen verringert, und man erzielt ein gleichmäßigeres Schichtwachstum. Bei den Rückstreu-elektronen handelt es sich um elastisch gestreute Elektronen. Die Ausbeute ist abhängig von der Ordnungszahl der Probenatome, so dass man bei heterogenen Proben einen Materialkontrast erkennen kann.^[70]

3.2.1 Energiedispersive Röntgenfluoreszenz

Ein weiterer Prozess, der bei dem Elektronenbeschuss auftreten kann, ist die Emission von Röntgenstrahlung. Die Wellenlänge liegt im Bereich 0,05 nm - 10 nm. Durch das Auftreffen des Elektronenstrahls auf die Probe können kernnahe Elektronen herausgeschlagen werden. Die entstandene Lücke wird durch den Rückfall eines Elektrons aus einer höheren Schale aufgefüllt. Die freiwerdende Energiedifferenz wird als Röntgenstrahlung emittiert. Diese ist elementspezifisch, so dass eine qualitative Analyse der Probenoberfläche möglich ist. Die Detektion der Röntgenstrahlung kann wellenlängen- oder energiedispersiv erfolgen.^[73,74]

3.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Bei der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wird die Probe wie bei der Rasterelektronenmikroskopie (Kapitel 3.2) mit einem eng fokussierten Elektronenstrahl (1 \AA - 10 \AA) bestrahlt.^[75] Die Beschleunigungsspannungen liegen typischerweise zwischen 60 keV und 300 keV. Im Gegensatz zur REM wird keine Probenoberfläche durch detektierte rückgestreute Elektronen abgebildet. Stattdessen werden die durch die Probe durchgestrahlten Elektronen detektiert.^[76]

Da die Elektronen beim Durchgang durch die Probe eine starke Coulomb-Wechselwirkung mit den Atomkernen erfahren, müssen die zu untersuchenden Proben hinreichend dünn sein. Die maximale Dicke hängt von der analytischen Fragestellung ab. Daher hat die Probenpräparation einen sehr hohen Einfluss auf die Messung. Für die Untersuchung der Morphologien und Durchmesser von Partikeln im Subnanometerbereich kann die Probe auf einen Kohlenstofffilm aufgebracht werden, der auf einem Kupfernetz fixiert ist.^[77]

Aufgrund der Durchstrahlung ist es möglich, die innere Struktur abzubilden. So können hohle Morphologien nachgewiesen werden oder auf Nanopartikeln aufgebrachte Schichten sichtbar gemacht werden. Die Transmissionselektronenmikroskopie ermöglicht neben der reinen Größen- und Morphologie-Bestimmung zahlreiche weitere Untersuchungen. Durch die Detektion von Röntgenstrahlung ermöglicht sie, orts aufgelöste Zusammensetzungen zu bestimmen (Kapitel 3.2.1). Durch Elektronenbeugung kann die Kristallstruktur bestimmt werden. Mit der Elektronenenergieverlustspektroskopie kann die Stöchiometrie der Probe bestimmt werden.^[77]

3.4 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (AFM, engl. *atomic force microscopy*) ist eine mikroskopische Methode zur Abbildung von Oberflächen im nanoskopischen Maßstab. Die laterale Auflösung beträgt einige Nanometer.

Die Rasterkraftmikroskopie geht auf Arbeiten von BINNIG, QUATE und GERBER^[78] aus dem Jahre 1986 zurück. Sie findet Anwendung in der Untersuchung von Oberflächen, die zum Teil beschichtet wurden,^[79,80] aber auch in der Untersuchung von Biomolekülen wie zum Beispiel DNA oder Proteinen^[81–83] und Nanopartikeln.^[84–86]

Präparative Bedeutung findet die Rasterkraftmikroskopie bei der *Dip-Pen-Lithography*, bei der eine Tinte mit einer AFM-Spitze direkt auf ein Substrat geschrieben wird, so dass eine laterale Auflösung von 30 nm erreicht werden kann.^[87–89]

Die Rasterkraftmikroskopie gehört, wie auch die Rastertunnelmikroskopie, zu den Raster-

sondenmikroskopien. Bei der AFM wird die Wechselwirkung zwischen einer Spitze und der Probenoberfläche gemessen. Die Spitze befindet sich an einem Federarm, dem sog. *Cantilever*. Dieser wird mit einem Laserstrahl bestrahlt, der anschließend auf eine 4-segmentige Photodiode geleitet wird.^[90,91] Kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen der Probenoberfläche und der Spitze, so biegt sich der *Cantilever*, und der Laserstrahl trifft ein anderes Segment der Photodiode.

Um ein Bild der Oberflächentopographie darzustellen, wird die Oberfläche der Probe abgerastert. Dieses Abrastern kann in verschiedenen Messmodi erfolgen. Beim *Contact-Mode* steht die Spitze in direktem mechanischen Kontakt mit der zu untersuchenden Oberfläche. Es lassen sich hierbei der *Constant-Force-Mode* und der *Constant-Height-Mode* unterscheiden.

Beim *Constant-Force-Mode* wird die Kraft zwischen Federarm und Probe durch Variation des Abstandes konstant gehalten. Der Abstand zum Federarm wird durch Auslenkung der Piezoelemente in z -Richtung erreicht. Anhand der Bewegung in z -Richtung kann die Topographie der Probe dargestellt werden. Diesem Modus steht der *Constant-height-Mode* gegenüber, bei dem der Abstand zur Messspitze nicht nachgeregelt wird. Hier wird die Kraft zwischen Probe und Messspitze aus der Auslenkung des *Cantilevers* bestimmt. Vom *Contact-Mode* unterscheidet sich der *Non-Contact-Mode*. Im *Non-Contact-Mode* wird der *Cantilever* zu Schwingungen angeregt und in einem Abstand von etwa 100 nm über die Probe gefahren. Dabei werden die auftretenden Kräfte detektiert. Der *Tapping-Mode* ist eine Variante des *Non-Contact-Mode*. In ihm wird der Federarm ebenfalls zu Schwingungen angeregt, dabei jedoch so weit an die Probe gefahren, dass die Messspitze diese berührt. Die unterschiedlichen Modi sind schematisch in Abbildung 3.1 dargestellt.^[92]

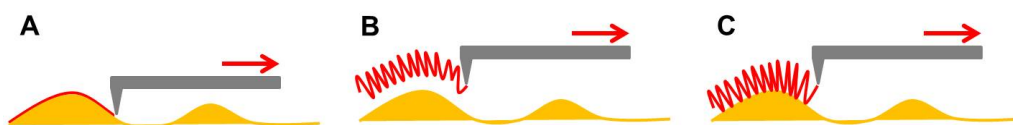


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des *contact-mode* (A), *non-contact-mode* (B) und *tapping-mode* (C) beim AFM.

Die Rasterkraftmikroskopie eignet sich auch für mechanische Untersuchungen. So ist es möglich, die mechanischen Eigenschaften von Zellen zu untersuchen.^[93,94] Durch Eindrucksversuche können hohle Morphologien nachgewiesen werden. Hierbei wird die Spitze auf die Oberfläche gedrückt. Die dadurch verursachte Verformung wird durch anschließendes Abrastern des Bildes visualisiert.^[95]

3.5 Infrarotspektroskopie

Die Infrarot(IR)-Spektroskopie basiert auf der Wechselwirkung von infrarotem Licht mit Materie. Der Wellenlängenbereich reicht von $800 \text{ nm} \leq \lambda \leq 1 \mu\text{m}$. Der typische Arbeitsbereich liegt zwischen $2,5 \mu\text{m}$ und $25 \mu\text{m}$ bzw. die Wellenzahlen liegen im Bereich $400 \text{ cm}^{-1} \leq \tilde{\nu} \leq 4000 \text{ cm}^{-1}$.^[96] Die Energie ist geringer als die des sichtbaren Lichtes. Mit ihr können im Analyten mechanische Schwingungen und Rotationen angeregt werden. Aus der Infrarotspektroskopie können Informationen über funktionelle Gruppen im Analyten gewonnen werden.^[97]

Bei der Fourier-Transformation-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) wird das gesamte Spektrum mit einem Interferogramm erfasst. Eine Besonderheit stellt die ATR-Infrarot-spektroskopie (engl. *attenuated total reflection*) dar.^[98] Sie eignet sich insbesondere für viskose Substanzen, aber auch für Fasern und Beschichtungen.^[96] Die infrarote Strahlung wird auf einen durchlässigen Kristall gestrahlt, der in direktem Kontakt mit der Probe ist. Die Eindringtiefe der Strahlung liegt typischerweise im Bereich zwischen $0,25 \mu\text{m}$ und $4 \mu\text{m}$. Die Strahlung wird reflektiert und detektiert.^[99]

Neben einer Absorptionsspektroskopie ist auch eine Infrarot-Emissionsspektroskopie möglich, bei der die erwärmte Probe als Lichtquelle dient. Die gemessenen Emissionbanden entsprechen Übergängen von angeregten Schwingungszuständen in den Grundzustand.^[100]

3.6 UV/Vis-Spektroskopie

Bei der UV/Vis Spektroskopie werden Elektronen durch Absorption von Lichtquanten vom Grundzustand in einen angeregten Zustand überführt. Die Bereiche eines Moleküls, die UV/Vis-Strahlung absorbieren, werden Chromophore genannt.^[96] Die wichtigsten Übergänge sind $n \rightarrow \pi^*$ Übergänge und $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergänge, $\sigma \rightarrow \sigma^*$ Übergänge und $n \rightarrow \sigma^*$ Übergänge. Diese werden bei Wellenlängen von etwa 130 nm bzw. 200 nm angeregt. Bei der UV/Vis-Spektroskopie wird die Absorption in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ gemessen. Der Arbeitsbereich liegt typischerweise bei $200 \text{ nm} \leq \lambda \leq 800 \text{ nm}$.^[99]

Mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie lassen sich Konzentrationen von Chromophoren bestimmen. Tritt ein Lichtstrahl der Wellenlänge λ durch eine Probe, so wird die Intensität des eintretenden Lichts I_0 durch Absorption, Reflektion und Streuung auf die Intensität I abgesenkt. BOUGOUER und LAMBERT fanden einen linearen Zusammenhang zwischen der Absorption und der Schichtdicke d der verwendeten Messküvette. BEER fand einen proportionalen Zusammenhang zwischen der Absorption und der molaren Konzentration c des Analyten bei einer konstanten Schichtdicke. Diese Beobachtungen werden im

LAMBERT-BEER'schen Gesetz kombiniert. Für die Extinktion $E(\lambda)$

$$E(\lambda) = -\log \frac{I}{I_0} \quad (3.17)$$

gilt

$$E(\lambda) = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot d, \quad (3.18)$$

wobei ϵ_λ den molaren Extinktionskoeffizienten beschreibt. Der molare Extinktionskoeffizient hat die Einheit $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$.^[101] Die Absorptionsmaxima von UV-Chromophoren können durch unterschiedliche Faktoren, wie zum Beispiel den pH-Wert, verschoben werden. Eine hyperchrome Verschiebung bedeutet ein höheres Absorptionsmaximum. Dem gegenüber steht die Hypochromie. Unter einer hypsochromen Verschiebung versteht man die Verschiebung des Absorptionsmaximums zu niedrigen Wellenlängen, unter der Bathochromie die Verschiebung zu hohen Wellenlängen.^[102,103]

3.7 Fluoreszenzspektroskopie

Im Gegensatz zur UV-Spektroskopie (Kapitel 3.6) handelt es sich bei der Fluoreszenzspektroskopie um eine Emissionsspektroskopie. Die Fluoreszenz beruht darauf, dass Photonen von einem Molekül absorbiert werden und hierdurch ein Elektron vom Singulett-Grundzustand S_0 in einen angeregten Singulett-Zustand S_n angeregt wird. Beim Rückfall in den Grundzustand wird die freiwerdende Energiedifferenz als Photon emittiert.^[97,104] Die Lebensdauer des angeregten Zustandes beträgt etwa 10 ns.^[105]

Nach dem FRANCK-CONDON-Prinzip erfolgt der Übergang vom Schwingungsgrundzustand des elektronischen Grundzustandes S_0 in das Schwingungsniveau des Zustandes S_n , bei dem der Bindungsabstand gleich ist. Bei der Relaxation kommt es zu strahlungslosen Übergängen in den Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustandes. Daher ist die Emissionswellenlänge gegenüber der Absorptionswellenlänge zu höheren Wellenlängen verschoben. Diese Verschiebung wird als STOKES-Verschiebung bezeichnet.^[99] Erfolgt die Anregung aus einem angeregten Schwingungszustand und die Emission in den Grundzustand, so hat die Emission eine höhere Wellenlänge als die Absorption.^[106]

Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine sehr empfindliche Methode, deren Vorteil unter anderem im zerstörungsfreien Arbeiten liegt. Sie findet besonders in den Biowissenschaften Anwendung. Ein Nachteil besteht in der Empfindlichkeit gegenüber Temperatur- oder pH-Wert-Änderungen. Mit Fluoreszenzmessungen ist eine Quantifizierung des Analyten

möglich, der lineare Bereich ist jedoch geringer als bei der Photometrie.^[96]

3.8 Röntgenpulverdiffraktometrie

Die Röntgenpulverdiffraktometrie dient zur Strukturaufklärung kristalliner Verbindungen. Treffen Röntgenstrahlen auf einen Kristall, so werden sie an der Elektronendichte gebeugt. Hierbei kommt es aufgrund des Gangunterschieds zu Interferenzerscheinungen, so dass nur bei bestimmten Einfallswinkeln der gebeugte Röntgenstrahl detektiert werden kann. Die grundlegende Gleichung ist die BRAGG-Gleichung

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin(\theta). \quad (3.19)$$

d bezeichnet den Netzebenenabstand, λ die Wellenlänge der Röntgenstrahlung, θ den Einfallswinkel und n eine ganze Zahl. Ist die BRAGG-Gleichung erfüllt, so kommt es zu einer konstruktiver Interferenz. In einem Diffraktogramm wird die Intensität der gebeugten Röntgenstrahlung in Abhängigkeit vom Einfallswinkel aufgetragen.^[107] Bei der Pulverdiffraktometrie werden keine Einkristalle benötigt, sondern die pulverisierte Probe gemessen. Aus der Breite der so erhaltenen Reflexe lassen sich Aussagen über die Kristallit-Größe treffen. Hierzu wird die SCHERRER-Gleichung

$$D = \frac{k\lambda}{B \cos(\theta)} \quad (3.20)$$

verwendet. D ist die Halbwertsbreite des Reflexes, k der Formfaktor, B die Kristallit-Größe und θ der Einfallswinkel.^[108]

3.9 Thermogravimetrie

Bei einer Thermogravimetrie wird die Massenänderung einer Probe in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt. Die Temperatur wird während der Messung erhöht. Hierbei kann es zu unterschiedlichen physikalischen oder chemischen Prozessen kommen, die eine Massenänderung zur Folge haben.^[96]

Zu den physikalische Prozessen gehören Verdampfung, Desorption und Sublimation. Wichtige chemische Prozesse sind Oxidation, Zersetzung und Festkörperreaktionen der Probe.^[109]

Die zu messende Probe wird in einem inerten Probenhalter in den Ofen gestellt und mit einem definierten Heizprogramm erwärmt. Die Atmosphäre kann oxidativ oder inert ge-

wählt werden. Der Probenhalter steht mit einer Waage in Verbindung. Die beim Erhitzen freiwerdenden Gase werden aus dem Gerät abgeleitet.^[96] Die wichtigsten Faktoren bei einer Messung sind die Atmosphäre im Ofen, die Heizrate sowie Eigenschaften der Probe wie die thermische Leitfähigkeit. Eine Fehlerquelle ist der thermische Auftrieb, den Probe und Probenhalter während der Messung erfahren. Dieser Fehler lässt sich durch Subtraktion einer Leermessung bei gleichen Parametern wie bei der Probenmessung reduzieren.^[110] Die Thermogravimetrie eignet sich zur Kopplung mit Infrarotspektroskopie oder Massenspektrometrie. Hierbei werden die bei der Messung freiwerdenden Gase direkt weitergeleitet und analysiert.^[111,112]

3.10 Elementaranalyse

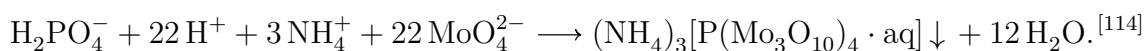
Die Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff, und Schwefel können über eine Verbrennung der Probe und anschließende gaschromatographische Trennung der Verbrennungsprodukte quantifiziert werden. Als Verbrennungsprodukte entstehen CO_2 , H_2O , NO_x und SO_x . Die Verbrennungsgase werden über einen Kupferkatalysator geleitet. Hier erfolgt eine Reduktion von SO_x zu SO_2 und von NO_x zu N_2 . Anschließend werden die Gase gaschromatographisch getrennt und mittels Wärmeleitfähigkeitsdetektor quantifiziert.^[113]

Andere Elemente lassen sich mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) quantifizieren. Bei der AAS wird die Probe atomisiert. Dies kann z.B. mit einer Acetylen-Flamme oder in einem beheizten Graphitofen erfolgen. Die Atome des Analyten werden mit einer für das entsprechende Element spezifischen Wellenlänge bestrahlt. Hierbei wird das einfallende Licht mit der Intensität I_0 absorbiert, so dass es zu einer Abschwächung auf eine Intensität I nach

$$I = I_0 \exp(-kcl) \quad (3.21)$$

mit dem Abschwächungskoeffizienten k , der Konzentration c und der Länge l kommt. Durch einen Vergleich der Intensität des eingestrahltten Lichtes mit der Intensität des austretenden Lichtes kann nach Kalibration eine Quantifizierung erfolgen.

Die Phosphatbestimmung erfolgt über den Phosphormolybdänblau-Nachweis. Hierbei reagieren die Phosphationen in saurer Lösung mit Ammoniummolybdat zur Molybdatophosphorsäure.



Die Quantifizierung erfolgt nach externer Kalibration mit dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz (Gleichung 3.18).

3.11 Spezifische Oberfläche

Die spezifische Oberfläche lässt sich mit der BET-Methode bestimmen. Diese ist nach den Entwicklern BRUNAUER, EMMETT und TELLER benannt, die die Methode 1938 erstmals beschrieben.^[115]

Grundlage für die Methode ist die Bestimmung der Menge des gasförmigen Adsorbates, das notwendig ist, um die Oberfläche der zu untersuchenden Probe mit einer Monolage zu bedecken. Diese Stoffmenge kann aus der Adsorptionsisotherme mit der BET-Gleichung berechnet werden.^[116]

Als Gase lassen sich zum Beispiel Stickstoff oder Argon verwenden, die gut an der Oberfläche des zu bestimmenden Stoffs durch Physisorption adsorbieren. Zur Bestimmung der Gasmenge gibt es unterschiedliche Möglichkeiten. Zum Einen lässt sich das gasförmige Adsorptiv bei einer konstanten Temperatur in den Probenbehälter mit der zu untersuchenden Substanz gegeben. Das aufgenommene Adsorbat wird im Gleichgewicht mit dem Gasdruck p gemessen und gegen den Relativdruck $\frac{p}{p_0}$ als Isotherme aufgetragen.

Zum Anderen ist es möglich, die Wärmeleitfähigkeit eines Gasgemisches zu messen, das durch die Apparatur geleitet wird. Durch Abkühlen auf die Siedetemperatur des einen Gases wird dieses adsorbiert, so dass sich die Wärmeleitfähigkeit des Gasgemisches ändert. Durch Aufheizen kommt es zur Desorption, die ebenfalls durch eine Änderung der Wärmeleitfähigkeit bestimmt werden kann.

Für Stoffe, die das Messgas chemisch absorbieren, liefert die BET-Methode keine zuverlässigen Daten.^[117]

3.12 MTT-Test

Beim MTT-Test handelt es sich um einen kolorimetrischen Nachweis von lebenden Zellen zur quantitativen Bestimmung der Zellvitalität. Er beruht auf der enzymatischen Reduktion des gelben 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromids in das dunkelviolette Formazan (Abbildung 3.2).^[118,119] Tote Zellen werden mit dem MTT-Test nicht detektiert.^[120,121]

Das Absorptionsmaximum von Formazan ist abhängig vom pH-Wert und der Zelldichte und liegt zwischen $560 \text{ nm} \leq \lambda \leq 560 \text{ nm}$.^[122]

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Zellvitalität wurde

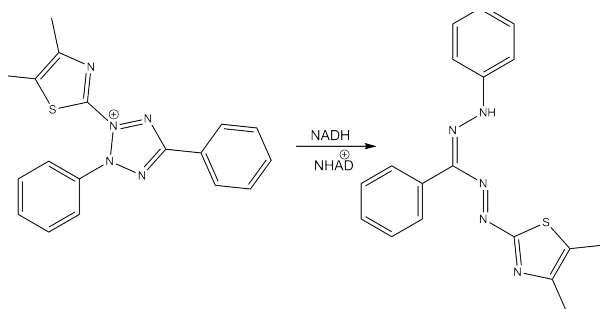


Abbildung 3.2: Reduktion von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

eine Lösung aus 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid in PBS mit einer Konzentration von 5 mg mL^{-1} frisch angesetzt. Anschließend wurde es mit Zellkulturmedium auf eine Konzentration von 1 mg mL^{-1} verdünnt. Anschließend wurden $300 \mu\text{L}$ des Zellmediums der zu untersuchenden Probe entnommen und durch die MTT-Lösung ersetzt. Es erfolgte eine ein-stündige Inkubation bei 37°C in einer 5 %-igen CO_2 -Atmosphäre. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von $100 \mu\text{L}$ Dimethylsulfoxid (DMSO) und eine 30 minütige Inkubation. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte photometrisch durch die Bestimmung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 560 nm .

Die zell-experimentellen Arbeiten wurden von Frau M. Sc. Chernousova , M. Sc. Rotan und Frau M. Sc. Kozlova durchgeführt.

3.13 Transfektionsexperimente

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transfektionsexperimente wurde EGFP-kodierende DNA verwendet. Als Zellen wurden MG-63-Zellen (humane Osteoblasten-ähnliche Zellen) oder HeLa-Zellen (Zervix-Epithelzellen) verwendet. Zur Transfektion wurden die Zellen mit einer bekannten Zelldichte mit der DNA-haltigen Dispersion versetzt. Die jeweils verwendeten Mengen sind in den einzelnen Kapiteln aufgeführt. Die Inkubation erfolgte in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum. Die Inkubationen erfolgten bei 37°C in einer 5 %-igen CO_2 -Atmosphäre. Die Inkubationsdauern sind in den einzelnen Kapiteln aufgeführt

Als Kontrollexperimente wurden Transfektionen mit Lipofektamin 2000 nach Herstellerangabe durchgeführt. Bei den durchgeführten Experimenten wurde 7 Stunden nach Zugabe der Dispersion das Zellmedium abgesaugt und durch frisches Zellmedium ersetzt. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz erfolgte durch die Bestimmung des Anteils fluoreszierender Zellen mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie nach Formel 5.2 Für die

Experimente wurde EGFP-kodierende DNA (pcDNA3-EGFP,Macherey-Nagel) verwendet.

4 Funktionalisierung von Ostim

4.1 Stabilisierung von Ostim mit kationischen Polymeren

4.1.1 Einleitung

Bei Ostim handelt es sich um phasenreinen Hydroxylapatit, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. Dieser liegt in Form von nanoskopischen Stäbchen mit einer Länge von etwa 200 nm und einem Durchmesser von etwa 20 nm vor. Ostim ist ein in der Mund- und Kieferchirurgie etabliertes Knochenersatzmaterial. In der Kieferchirurgie wird es als wässrige Dispersion mit einer Massenkonzentration von $c = 35\%$ angewendet und mit einer Spritze direkt in die Kieferhöhle appliziert. Aufgrund der pastenartigen Beschaffenheit kann es zu einem guten Kontakt mit dem Knochen kommen.^[123,124]

In der Literatur werden Komposite auf Basis von Ostim vorgestellt.^[125–130] Dabei werden sowohl biodegradierbare Polymere wie Gelatine^[127,130], Polyvinylalkohol^[129] oder Polylactid^[125] als auch Polymethylmethacrylat als biokompatibles aber nicht -degradierbares Polymer^[126] verwendet. In diesen Systemen liegt das Calciumphosphat nicht in freier dispergierter Form vor sondern ist in die Polymermatrix eingebaut.

In der Forschung dient Ostim, das mit dem kationischen Polymer Polyethylenimin stabilisiert wurde, als Träger für Nukleinsäuren.^[43,131]

In diesem Kapitel wird die Stabilisierung von Ostim mit unterschiedlichen kationischen Polymeren untersucht. Hierbei wird neben der Art des Polymers auch die Kettenlänge variiert. Neben der kolloid-chemischen Charakterisierung wird der auf den Partikeln adsorbierte Polymeranteil bestimmt. Außerdem wird die Beladungskapazität dieser stabilisierten Partikel mit DNA bestimmt. Im Anschluss wird die Transfektionseffizienz der mit kationischen Polyelektrolyten stabilisierten und DNA-beladenen Partikeln sowie deren Zelltoxizität untersucht.

4.1.2 Charakterisierung von unfunktionalisiertem Ostim

Zur Charakterisierung des unfunktionalisierten Ostims wurde eine 6 %-ige Dispersion für 20 Minuten bei 4700 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Niederschlag bei 40 °C getrocknet. Anschließend erfolgten rasterelektronenmikroskopische und

röntgenpulverdiffraktometrische Untersuchungen.

4.1.3 Stabilisierung von Ostim und Umladung mit DNA

Die Stabilisierung von Ostim mit kationischen Polymeren erfolgte nach KLESING^[132] durch Verdünnen von 1 mL einer Ostim-Dispersion mit einer Konzentration von 60 g L^{-1} auf 20 mL mit Reinstwasser. Für die Stabilisierungen wurde 1 mL dieser 0,3 %-igen Dispersion mit 8 mL Reinstwasser verdünnt und mit 1 mL einer Polyelektrolytlösung mit einer Konzentration von 2 g L^{-1} versetzt. Anschließend wurde die Dispersion mittels Ultraschalldispenser (Sonotrode 7, Amplitude 50 %) für eine Minute ultrabeschallt. Zur Abtrennung des überschüssigen, nicht an die Partikeloberfläche adsorbierten Polymers wurde die Dispersion für 30 Minuten bei 4700 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zentrifugat im gleichen Volumen Reinstwasser mit Hilfe des Ultraschalldispensers (Sonotrode 7, Amplitude 50 %) 2 Minuten redispegiert.

Als Polymere wurden lineares Polyethylenimin (PEI) mit mittleren molaren Massen von 2000 Da und 750000 Da, verzweigtes Polyethylenimin mit einer molaren Masse von 25000 Da, Polyallylaminhydrochlorid (PAH) mit molaren Massen von 15000 Da und 56000 Da, Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC) mit einer molaren Masse von 100000 Da sowie α -Polylysin (α PLL) mit einer molaren Masse von 15000 Da und ϵ -Polylysin (ϵ PLL) mit einer molaren Masse von 3500 Da verwendet.

Alle Polymere wurden in Reinstwasser gelöst. Lediglich das Polyallylaminhydrochlorid mit 56000 Da wurde ausgehend von SCHWIERTZ^[133] in einer Natriumchloridlösung mit einer Konzentration von $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ gelöst, um ein besseres Quellen des Polymers zu erreichen. Die Charakterisierung erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung und Messung des ζ -Potentials. Zur Quantifizierung der auf den Partikeln adsorbierten Polymermenge wurden die Dispersionen zentrifugiert und bei 40°C getrocknet und der Feststoff mittels Thermogravimetrie charakterisiert. Die Thermogravimetrie erfolgte in einem Korundtiegel unter einer dynamischen O_2 -Atmosphäre. Die Heizrate betrug für alle Messungen 2 K min^{-1} . Die Temperatur lag zwischen 30°C und 1000°C . Um Messfehler durch thermischen Auftrieb zu minimieren, wurde die Massenänderung in Abhängigkeit der Temperatur eines leeren Korundtiegels im Bereich von 30°C und 1000°C bei einer Heizrate von 2 K min^{-1} gemessen. Diese Leermessung wurde von allen aufgenommenen Thermogrammen subtrahiert. Zusätzlich erfolgte eine colorimetrische Bestimmung des auf den Partikeln adsorbierten PAH ($M_W = 15000 \text{ Da}$). Hierzu wurde FITC-markiertes PAH verwendet und UV-Vis-Spektren von der ungereinigten Dispersion, des Überstandes nach Zentrifugation und der redispegierten Probe aufgenommen.

Zur Bestimmung der DNA-Absorptionskapazität wurde jeweils 1 mL der jeweiligen re-dispergierten polymerstabilisierten Ostimdispersion mit unterschiedlichen Volumina einer DNA-Lösung ($c = 2 \text{ g L}^{-1}$) versetzt und mit einem Vortexmischer gemischt. Nach einer Equilibrationszeit von 10 Minuten erfolgte eine Charakterisierung der Dispersion mittels dynamischer Lichtstreuung. Die erfolgreiche DNA-Adsorption wurde durch Messung des ζ -Potentials nachgewiesen.

Es wurden Umladungsexperimente mit einer kurzkettigen DNA (50 Basenpaare) als Modell für RNA und einer längerkettigen DNA (2000 Basenpaare) als Modell für Transfektionsexperimente durchgeführt.

Auswertung

4.1.4 Charakterisierung von Ostim

Unfunktionalisiertes Ostim wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Eine repräsentative Aufnahme ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Es ist deutlich die stäbchenförmige Morphologie der Partikel zu erkennen. Die Länge der Stäbchen liegt zwischen 100 nm und 200 nm, der Durchmesser liegt bei etwa 20 nm.

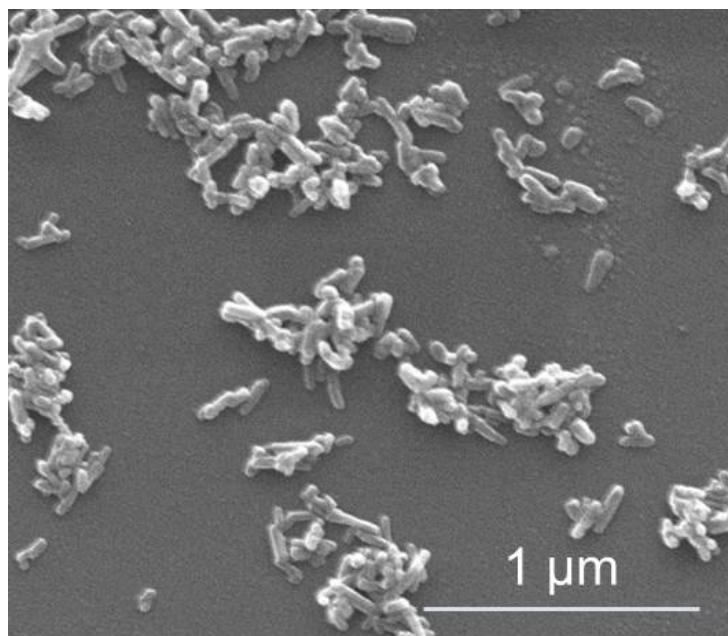


Abbildung 4.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Ostimpartikeln.

In Abbildung 4.2 ist ein Röntgenpulverdiffraktogramm von einer zentrifugierten und bei 40 °C getrockneten Ostimdispersion dargestellt. In rot sind die Literaturreflexe für pha-

senreinen Hydroxylapatit dargestellt. Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung zwischen den gemessenen Reflexen und den Literaturreflexen.

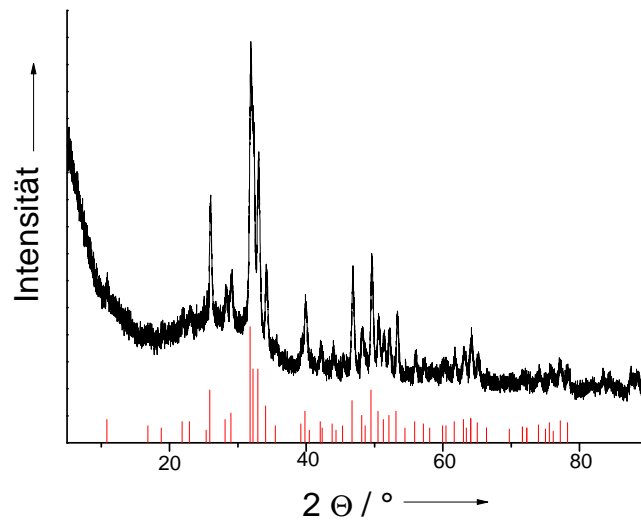


Abbildung 4.2: Röntgenpulverdiffraktogramm von Ostim (schwarz) mit Literaturreflexen (ICDD-Datenbank 84-1998) für Hydroxylapatit (rot).

4.1.5 Ostim mit Polyallylaminhydrochlorid

Polyallylaminhydrochlorid ist aus der Literatur für den Aufbau von Layer-by-Layer-Schichten bekannt. Das verwendete Polymer hatte eine mittlere molare Masse von 15000 Da. Die Monomereinheit ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Die Monomereinheit trägt 1 primäres Amin, so dass das Polymer in wässriger Lösung protoniert vorliegt und Partikel elektrosterisch stabilisieren kann. Die Größenverteilung ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

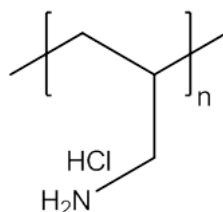


Abbildung 4.3: Monomereinheit von Polyallylaminhydrochlorid (unprotoniert).

Die Partikel hatten eine durchschnittliche Größe von 191 nm. Der Polydispersitätsindex betrug 0,18. Das Maximum der Intensitäts-gewichteten Größenverteilung lag bei 230 nm, das Maximum der Anzahl-gewichteten Größenverteilung bei 91 nm. Das ζ -Potential (Abbildung 4.5) lag bei 35 ± 5 mV. Es konnten monodisperse, elektrostatisch stabilisierte

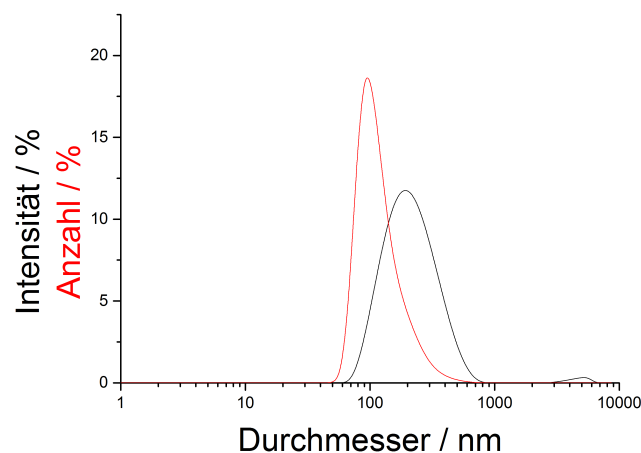


Abbildung 4.4: Mittels dynamischer Lichtstreuung ermittelte Intensitäts- (schwarz) und Anzahl-gewichtete (rot) Größenverteilung von Ostim, dass mit PAH ($M_W = 15000$ Da) stabilisiert wurde.

Partikel dargestellt werden. Zur Bestimmung der adsorbierten Polymermenge wurden die getrockneten Partikel mittels Thermogravimetrie untersucht. Zur Reduzierung von Fehlern durch thermischen Auftrieb wurde die temperaturabhängige Massenänderung einer

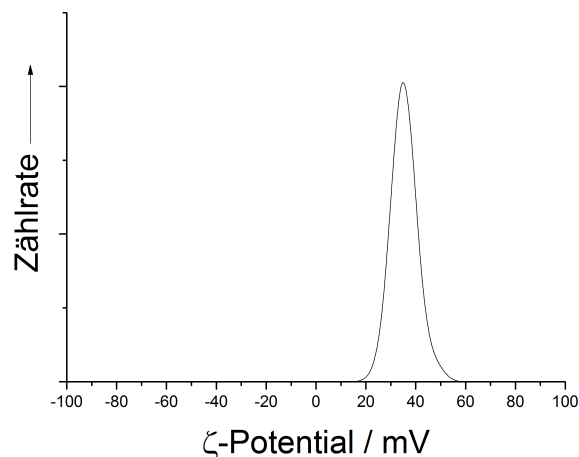


Abbildung 4.5: ζ -Potential von PAH-stabilisierten Ostimpartikeln.

Leerprobe gemessen und von den zu messenden Proben subtrahiert. In Abbildung 4.6 sind das Thermogramm einer nicht korrigierten (A) und einer korrigierten Messung (B) abgebildet.

Es ist ein deutlicher Unterschied im Verlauf zu erkennen. Im unkorrigierten Thermogramm ist ein deutlicher Anstieg der Masse bis etwa 200 °C zu erkennen. Dieser ist auf den thermischen Auftrieb zurückzuführen, den die Probe während des Heizens erfährt. Es resultiert eine deutlich unterschiedliche Massendifferenz, die zwischen der korrigierten und der nicht korrigierten Probe bei etwa 70 % liegt. Der Polymeranteil liegt bei ca. 5,4 %.

Im Bereich von 30 °C bis etwa 150 °C ist ein Masseverlust von etwa 0,5 % zu erkennen, der auf in der Probe enthaltene Restfeuchte zurückgeführt werden kann.

Zusätzlich wurde eine colorimetrische Polymerquantifizierung mit FITC-markiertem PAH durchgeführt. Für die Kalibration wurden UV/Vis-Spektren von FITC-markiertem PAH mit einer mittleren molaren Masse von 15000 Da in Reinstwasser aufgenommen. In Tabelle 4.1 sind die Probenzusammensetzungen, die Absorptionsmaxima sowie deren Lagen aufgeführt.

Die Absorptionen in Abhängigkeit der Polymermenge zeigen eine sehr gute lineare Korrelation. Die Kalibrationsgerade ist in Abbildung 4.7 dargestellt. Zur Darstellung der PAH-stabilisierten Ostim-Partikel wurden 800 μL einer 0,3%-igen Ostim-Dispersion mit 8,2 mL H_2O verdünnt. Anschließend wurden 500 μL der PAH-FITC-Lösung mit einer Massenkonzentration von 2 g L^{-1} zugegeben, und es erfolgte eine Beschallung mittels Ultraschalldispenser (Sonotrode 2, 1 min)

Die Dispersion wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht. Hierzu wurden 1,0 mL

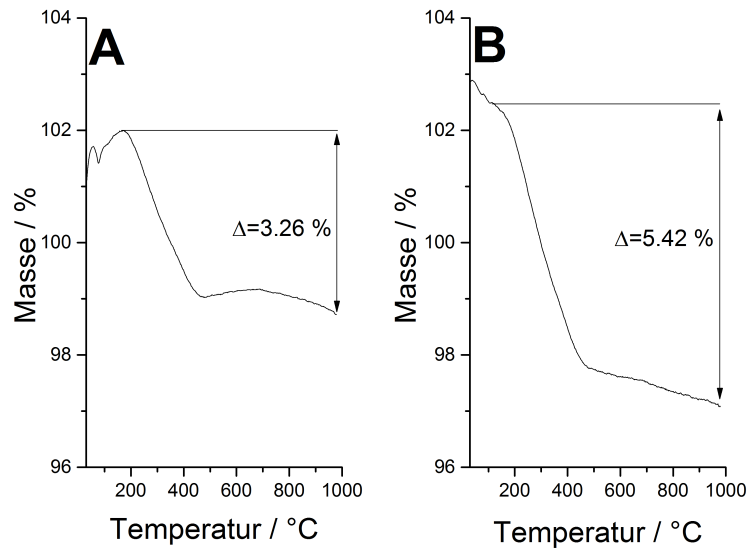


Abbildung 4.6: Thermogravimetrische Untersuchung von PAH-stabilisiertem Ostim unter einer dynamischen Sauerstoffatmosphäre ohne Leertiegelkorrektur (A) und mit Leertiegelkorrektur (B).

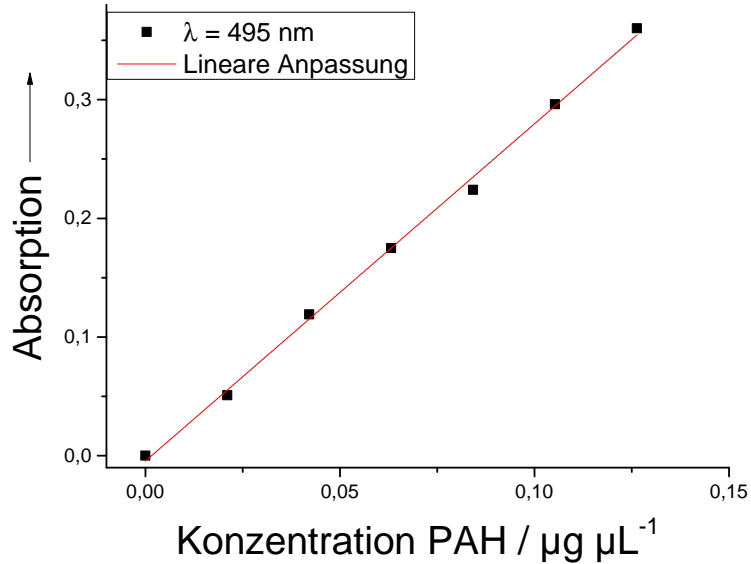


Abbildung 4.7: Mittels UV/Vis-Spektroskopie ermittelte Absorption von FITC-markiertem PAH.

der Dispersion entnommen. Anschließend wurde die verbleibende Dispersion bei 20000 U min^{-1} für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, anschließend wurde das

Tabelle 4.1: Absorptionsmaxima von FITC-markiertem PAH in unterschiedlichen Konzentrationen.

Probe	$V_{\text{PAH-FITC}}$	$V_{\text{H}_2\text{O}}$	Absorptionsmaximum	
	/ μL	/ μL	/ nm	/ a.u.
1	0	950	495	0,0
2	10	940	495	0,051
3	20	930	495	0,119
4	30	920	495	0,175
5	40	910	495	0,224
6	50	900	495	0,296
7	60	890	495	0,360

Zentrifugat in 8,5 mL H_2O mittels Ultraschalldisperser (Sonotrode 2, 1 min.) redispergiert. Überstand und redispergierte Dispersion wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie analysiert. Die zugehörigen Spektren sind in Abbildung 4.8 gezeigt.

Nach Basislinienkorrektur ergeben sich Intensitäten von 0,297 a.u. für die Dispersion. Die

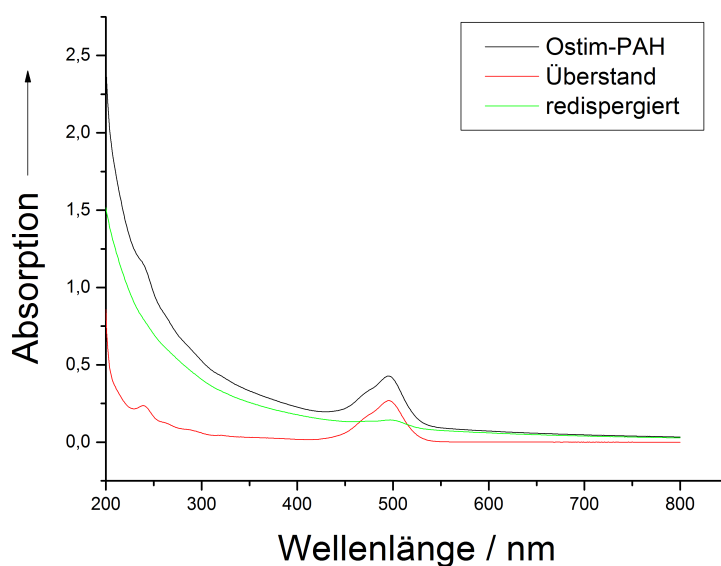


Abbildung 4.8: UV/Vis-Spektren von PAH-FITC-funktionalisierten Ostimpartikeln (schwarz), dem Überstand nach Zentrifugation (rot) und den redispergierten Partikeln (grün).

enthaltene PAH-Menge entspricht der in Kalibrationsprobe 6 eingesetzten Menge. Es ergibt sich eine Differenz von

$$0,296 \text{ a.u.} - 0,297 \text{ a.u.} = -0,001 \text{ a.u.} \quad (4.1)$$

Diese entspricht einer Abweichung von

$$\frac{0,001 \text{ a.u.}}{0,296 \text{ a.u.}} = 0,34 \% \quad (4.2)$$

Die Absorption des Überstandes lag nach Basislinienkorrektur bei 0,258 a.u., die Absorption der redispergierten Dispersion lag bei 0,0450 a.u.

Der Vergleich der Absorptionen der Dispersion, des Überstandes und der redispergierten Probe zeigt eine sehr gute Übereinstimmung

$$\begin{aligned} I_{\text{Überstand}} + I_{\text{redispergiert}} &= \\ 0,258 \text{ a.u.} + 0,045 \text{ a.u.} &= 0,303 \text{ a.u.} \end{aligned} \quad (4.3)$$

Man erhält eine Differenz von

$$0,303 \text{ a.u.} - 0,297 \text{ a.u.} = 0,006 \text{ a.u.} \quad (4.4)$$

Dies entspricht einer Abweichung von

$$\frac{0,006 \text{ a.u.}}{0,297 \text{ a.u.}} = 2,0 \% \quad (4.5)$$

Aufgrund des linearen Bereichs der Kalibration kann das Verhältnis des in Lösung befindlichen PAHs und des auf dem Ostim enthaltenen PAHs bestimmt werden. Es sind

$$\frac{0,0450}{0,303} = 15 \% \quad (4.6)$$

des Polymers auf den Ostimpartikeln. Etwa 85 % des Polymers sind in der Lösung.

Es wurden 0,5 mL der Polymerlösung mit einer Massenkonzentration von 2 g L^{-1} eingesetzt. Dies entspricht einer Polymermenge von 1,0 g.

0,4992 g einer 6 %-igen Ostim Dispersion wurden auf 10 mL verdünnt. Dies entspricht einer Massenkonzentration von 3 mg mL^{-1} Zur Darstellung der funktionalisierten Ostimpartikel

wurden 800 μL dieser Dispersion eingesetzt, so dass 2,4 mg Ostim mit 1,0 mg Polymer eingesetzt wurden. Nach Zentrifugation sind 15 % ($\cong 150 \mu\text{g}$) des eingesetzten Polymers in der Dispersion enthalten.

Es sind somit 62,5 μg Polymer pro 1 mg Ostim aufgebracht worden. Der Polymergehalt der funktionalisierten Partikel liegt somit bei etwa 5,9 %.

Bei Ostim handelt es sich um phasenreinen Hydroxylapatit. Dieser hat eine Dichte von $3,16 \text{ g cm}^{-3}$.^[134]

Das Volumen des eingesetzten Ostims beträgt somit

$$\begin{aligned} V_{\text{Ostim}} &= \frac{2,4 \cdot 10^{-6} \text{ kg}}{3,16 \cdot 10^3 \text{ kg m}^{-3}} \\ &= 7,6 \cdot 10^{-10} \text{ m}^3. \end{aligned} \quad (4.7)$$

Bei Ostim handelt es sich um ein stäbchenförmiges Material mit einer Länge im Bereich von etwa 150 nm-200 nm und einem Durchmesser zwischen 15 nm-25 nm. Bei einer mittleren Länge von $h=175 \text{ nm}$ und einem mittleren Durchmesser von $d=20 \text{ nm}$ ergibt sich unter Annahme einer zylindrischen Form ein Volumen pro Nanopartikel von

$$\begin{aligned} V_{\text{Stäbchen}} &= \pi \cdot r^2 \cdot h \\ &= \pi \cdot (10^{-8} \text{ m})^2 \cdot 175 \cdot 10^{-9} \text{ m} \\ &= 5,4977 \cdot 10^{-23} \text{ m}^3 \end{aligned} \quad (4.8)$$

In der Dispersion sind somit

$$\begin{aligned} n = \frac{V_{\text{Ostim}}}{V_{\text{Stäbchen}}} &= \frac{7,6 \cdot 10^{-10} \text{ m}^3}{5,4977 \cdot 10^{-23} \text{ m}^3} \\ &= 1,38 \cdot 10^{13} \end{aligned} \quad (4.9)$$

Stäbchen enthalten. Dies entspricht einer Partikelkonzentration c von

$$\begin{aligned} c &= \frac{1,38 \cdot 10^{13} \text{ Partikel}}{9,5 \text{ mL}} \\ &= 1,45 \cdot 10^{12} \text{ Partikel mL}^{-1}. \end{aligned} \quad (4.10)$$

Die Oberfläche O eines Nanopartikels beträgt unter Annahme einer zylindrischen Form

$$\begin{aligned}
 O &= \text{Mantelfläche} + 2 \cdot \text{Grundfläche} \\
 &= \pi \cdot d \cdot h + 2 \cdot \pi \cdot r^2 \\
 &= \pi \cdot 20 \text{ nm} \cdot 175 \text{ nm} + 2 \cdot \pi \cdot (10 \text{ nm})^2 \\
 &= 1,162 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2.
 \end{aligned} \tag{4.11}$$

In der Lösung sind

$$\frac{150 \text{ } \mu\text{g}}{15000 \text{ g mol}^{-1}} = 1 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \tag{4.12}$$

Polymer enthalten. Dies entspricht

$$1 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1} = 6,02 \cdot 10^{15} \tag{4.13}$$

Molekülen. Es sind somit

$$\frac{6,02 \cdot 10^{15}}{1,162 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2 \cdot 1,38 \cdot 10^{13}} = 3,75 \cdot 10^{16} \text{ m}^{-2} \tag{4.14}$$

Moleküle pro m^2 bzw. 0,0375 Moleküle pro nm^{-2} enthalten. Ein Ostim-Partikel enthält etwa

$$\frac{6,02 \cdot 10^{15}}{1,38 \cdot 10^{13}} \approx 440 \tag{4.15}$$

Moleküle. Zur Bestimmung einer kritischen DNA-Menge wurde jeweils 1 mL der mit kationischen Polymeren stabilisierten Ostimdispersion mit unterschiedlichen Volumina einer DNA-Lösung versetzt. Die Charakterisierung erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung und Messung des ζ -Potentials. Als kritische DNA-Menge ist die maximal mögliche DNA-Menge zu verstehen, bei der die Partikel noch ein positives ζ -Potential und eine monodisperse Größenverteilung ohne Aggregatbildung aufweisen.

In Abbildung 4.9 sind hydrodynamische Durchmesser, Polydispersitätsindices und ζ -Potentiale von Ostimpartikeln, die mit Polallylaminhydrochlorid ($M_W = 15000 \text{ Da}$) stabilisiert wurden und mit unterschiedlichen DNA-Mengen versetzt wurden. Die Zugabe von DNA zu den kationischen Partikeln führt zu einer Verringerung des ζ -Potentials aufgrund des Ladungsausgleichs. Bei der Zugabe von mehr als 20 μg DNA zu 300 μg Calciumphos-

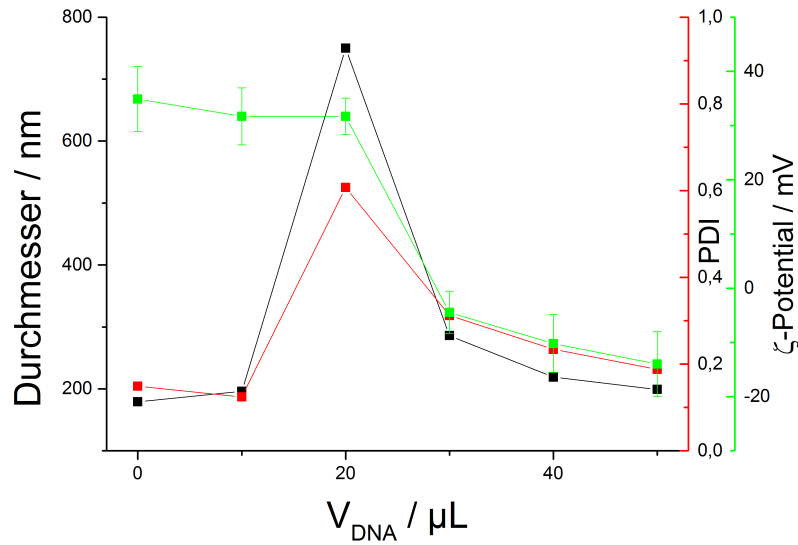


Abbildung 4.9: Hydrodynamische Durchmesser (schwarz), Polydispersitätsindices (rot) und ζ -Potentiale (grün) von PAH-stabilisierten Ostimpartikeln mit unterschiedlichen Volumina DNA-Lösung.

phat kommt es zu einer Umladung der Partikel. Die Partikelgröße nimmt zu, da keine ausreichende elektrostatische Stabilisierung erreicht werden kann. Bei weiterer Zugabe von DNA kommt es zu einer Sättigung. Die Partikel sind vollständig umgeladen, so dass weitere DNA nicht mehr adsorbiert und sich das ζ -Potential nicht weiter ändert.

Die kritische DNA-Menge für dieses System beträgt

$$\frac{20 \mu\text{g}_{\text{DNA}}}{300 \mu\text{g}_{\text{Ostim}}} = 66 \mu\text{g}_{\text{DNA}} \text{ mg}_{\text{Ostim}}^{-1}. \quad (4.16)$$

4.1.6 Ostim mit Polyallylaminhydrochlorid ($M_w=56 \text{ kDa}$)

Die Experimente mit dem Polyallylaminhydrochlorid mit einer molaren Masse von 56000 Da wurden analog zu den oben beschriebenen Experimenten durchgeführt.

Die mit PAH stabilisierten Ostimpartikel weisen einen hydrodynamischen Durchmesser von 180 nm auf. Mit einem PDI von 0,14 kann die Dispersion als monodispers angesehen werden. Das ζ -Potential ist mit $+46 \pm 6 \text{ mV}$ deutlich positiv. Das Maximum der Intensitäts-gewichteten Größenverteilung lag bei 185 nm, die Anzahl-gewichtete Größenverteilung hatte ein deutlich geringeres Maximum bei 91 nm. Die Größenverteilungen sind in Abbildung 4.10 abgebildet. Der mittels Thermogravimetrie ermittelte Polymeranteil ist mit 8 % sehr hoch im Vergleich zu den anderen untersuchten Systemen. In Abbildung 4.11

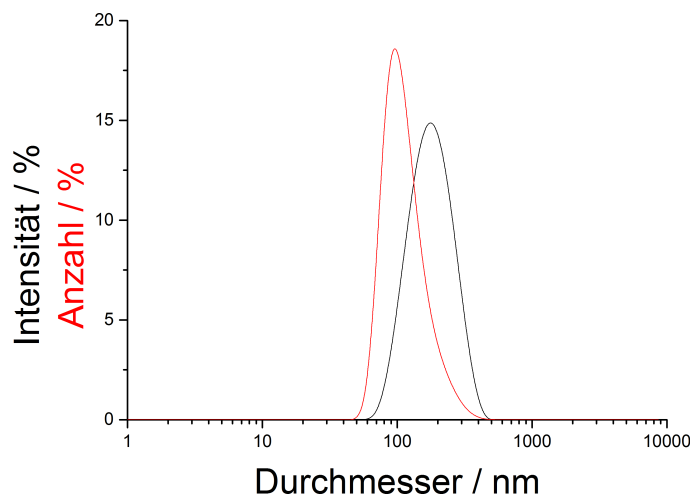


Abbildung 4.10: Anzahl- (rot) und Intensitäts-gewichtete (schwarz) Größenverteilung von Ostim nach stabilisierung mit PAH ($M_W = 56$ kDa).

ist die Masse in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen. Zur Bestimmung der DNA-Menge, die zu der Dispersion gegeben werden kann, ohne dass es zur Umladung kommt, wurden unterschiedliche Mengen DNA zu der Dispersion gegeben und die Größenverteilung mittels dynamischer Lichtstreuung gemessen sowie das ζ -Potential bestimmt. Die schwarze Kurve in Abbildung 4.12 zeigt den Verlauf des durchschnittlichen hydrodynamischen Durchmessers, die rote Kurve beschreibt den Polydispersitätsindex für die einzelnen Proben, in grün ist das ζ -Potential aufgetragen. Mit steigender DNA-Menge, die zugegeben wurde, steigt der hydrodynamische Durchmesser. Durchmesser und Polydispersitätsindex zeigen eine gute Übereinstimmung im Verlauf. Das ζ -Potential zeigt einen sigmoidalen Verlauf. Die Zugabe von geringen Mengen DNA führen zu einer geringen Änderung des ζ -Potentials. Bei einer kritischen Menge kommt es zu einem schlagartigen Abfall. Eine weitere Zugabe von DNA führt zu keiner Änderung des ζ -Potentials. Die Partikel sind vollständig mit DNA umgeladen, so dass eine Sättigung eintritt. Mit zunehmender DNA-Menge adsorbiert mehr DNA auf der Partikeloberfläche, so dass es zu einem Ladungsausgleich kommt. Hierdurch kommt es zu einer Abnahme der elektrostatischen Stabilisierung und einer Aggregatbildung. Diese ist an einer Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers und des Polydispersitätsindex zu erkennen. Eine kritische Menge, bei der die Partikel noch monodispers und kationisch sind, liegt bei 40 μL einer DNA-Lösung mit einer Konzentration von 2 g L^{-1} .

Die Calciumphosphatmenge in 1 mL der Dispersion entspricht 0,3 mg, die zugegebene DNA-Masse 40 μg . Bei diesem Verhältnis liegen kationische monodisperse Calciumphos-

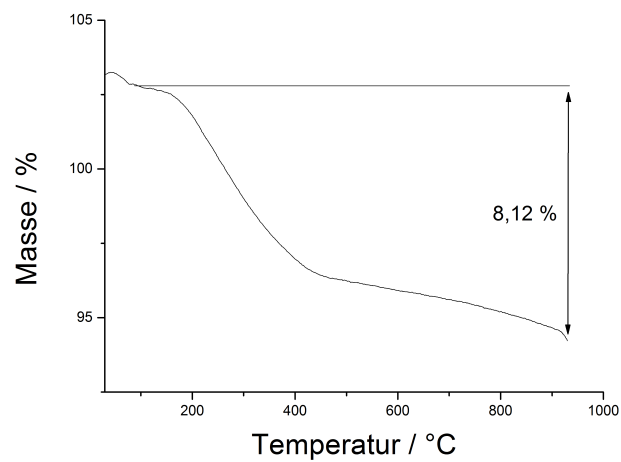


Abbildung 4.11: Änderung der Masse in Abhängigkeit von der Temperatur von PAH-stabilisiertem Ostim.

phatpartikel vor. Die kritische Menge beträgt somit

$$\frac{40 \mu\text{g}_{\text{DNA}}}{300 \mu\text{g}_{\text{Ostim}}} = 133 \mu\text{g}_{\text{DNA}} \text{ mg}_{\text{Ostim}}^{-1}. \quad (4.17)$$

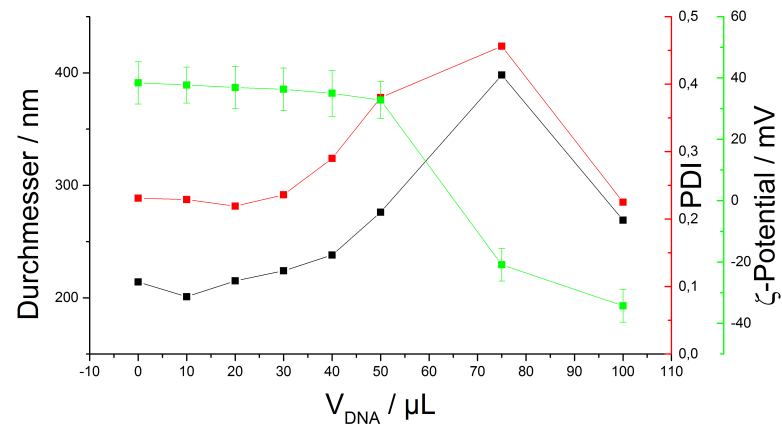


Abbildung 4.12: Hydrodynamische Durchmesser, Polydispersitätsindices und ζ -Potentiale von PAH-stabilisierten Ostimpartikeln mit unterschiedlichen Volumina DNA-Lösung.

4.1.7 Ostim mit linearem Polyethylenimin ($M_w=2$ kDa)

Zur Stabilisierung von Ostim mit kurzkettigem linearem Polyethylenimin (PEI) wurde ein Polymer mit einer mittleren molare Masse von 2000 Da verwendet. Polyethylenimin ist ein wasserlösliches Polyamin. Das lineare Polymer trägt sekundäre Amine, die in wässriger Lösung zum Teil protoniert vorliegen. Die Strukturformel der Monomereinheit ist in Abbildung 4.13 dargestellt.

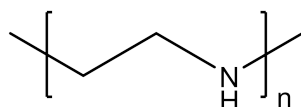


Abbildung 4.13: Strukturformel der Monomereinheit von linearem Polyethylenimin.

Die Größenverteilung der mit dem Polymer stabilisierten Partikel ist in Abbildung 4.14 dargestellt. Die Dispersion kann mit einem Polydispersitätsindex von 0,13 als monodispers angesehen werden. Der mittlere Durchmesser liegt bei 170 nm. Das Maximum der Intensitäts-gewichteten Größenverteilung liegt bei 196 nm, das Maximum der Anzahl-gewichteten Größenverteilung bei 106 nm. Die Partikel weisen mit 35 ± 16 mV trotz hoher

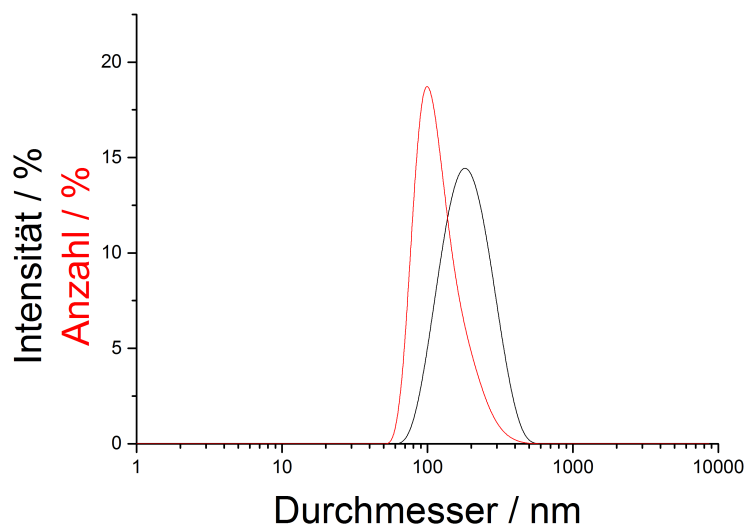


Abbildung 4.14: Hydrodynamische Durchmesser, Polydispersitätsindices und ζ -Potentiale von PEI-stabilisierten Ostimpartikeln mit unterschiedlichen Volumina DNA-Lösung.

Standardabweichung ein deutlich positives ζ -Potential auf. Der Polymergehalt lag bei etwa 3,4 %. Das Thermogramm ist in Abbildung 4.15 abgebildet.

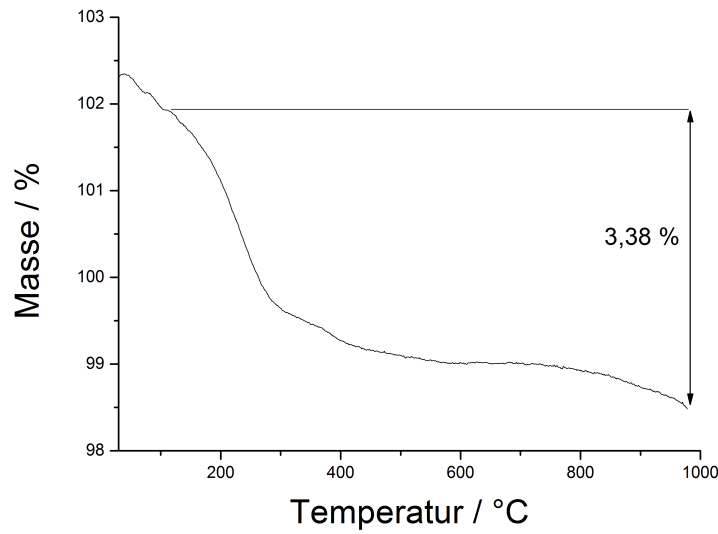


Abbildung 4.15: Thermogramm von Ostim, das mit Polyethylenimin ($M_W = 2000$ Da) stabilisiert wurde.

Die Ergebnisse der Beladungsexperimente mit DNA sind in Abbildung 4.16 dargestellt. In Abbildung 4.16 erkennt man sehr gut den Verlust der elektrostatischen Stabilisierung von PEI-stabilisierten Ostimpartikeln durch Zugabe von DNA mit einer Kettenlänge von 2000 Basenpaaren. Durch die Zugabe von $20\text{ }\mu\text{g}$ DNA zu $300\text{ }\mu\text{g}$ Ostim kommt es zu einer Brückenflockung (Abbildung 2.4) der Partikel. Dies zeigt sich in einem deutlichen Anstieg in der mittleren Größe der Partikel. Der Polydispersitätsindex nimmt einen Wert von fast 0,8 an, so dass keine genaue Aussage über den hydrodynamischen Radius getroffen werden kann. Eine höhere Zugabe von DNA führt zu einem Ladungsausgleich, der zu einer deutlichen Aggregation der Partikel führt. Durch eine noch höhere Zugabe von DNA werden die Partikel umgeladen, was am Verlauf des ζ -Potentials deutlich wird. Durch diese Stabilisierung der Partikel erhält man mit einem Polydispersitätsindex von 0,21 monodisperse Partikel, die einen hydrodynamischen Radius von etwa 200 nm aufweisen. Die kritische DNA-Menge beträgt

$$\frac{10\text{ }\mu\text{g}_{\text{DNA}}}{300\text{ }\mu\text{g}_{\text{Ostim}}} = 33\text{ }\mu\text{g}_{\text{DNA}}\text{ mg}_{\text{Ostim}}^{-1}. \quad (4.18)$$

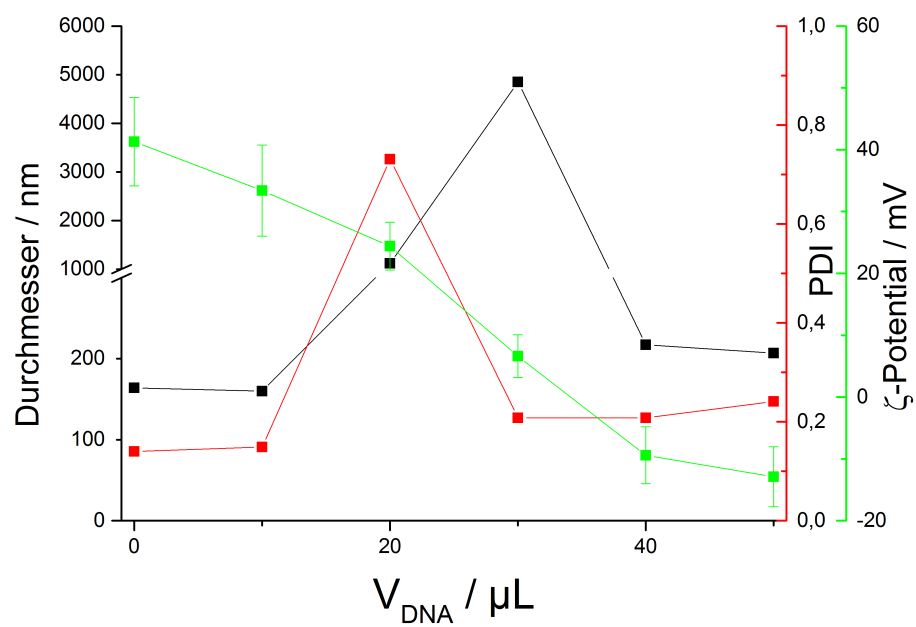


Abbildung 4.16: Umladungskurve von PEI ($M_W = 2000$ Da)-stabilisiertem Ostim (grün) mit den zugehörigen hydrodynamischen Durchmessern (schwarz) und den Polydispersitätsindices (rot).

4.1.8 Ostim mit verzweigtem Polyethylenimin ($M_W=25$ kDa)

Die Monomereinheit von dem verwendeten verzweigten Polyethylenimin zur Stabilisierung von Ostim ist in Abbildung 4.17 abgebildet. Das Polymer hat primäre, sekundäre und tertiäre Amingruppen. Nach Zugabe von Polyethylenimin zu der verdünnten Ostim-

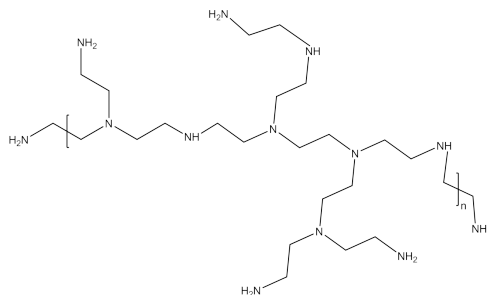


Abbildung 4.17: Monomereinheit von verzweigtem Polyethylenimin.

Dispersion wurden monodisperse, stark kationische Partikel erhalten. Das ζ -Potential lag bei 43 ± 10 mV Die Größenverteilung ist in Abbildung 4.18 dargestellt. Der Polydispersi-

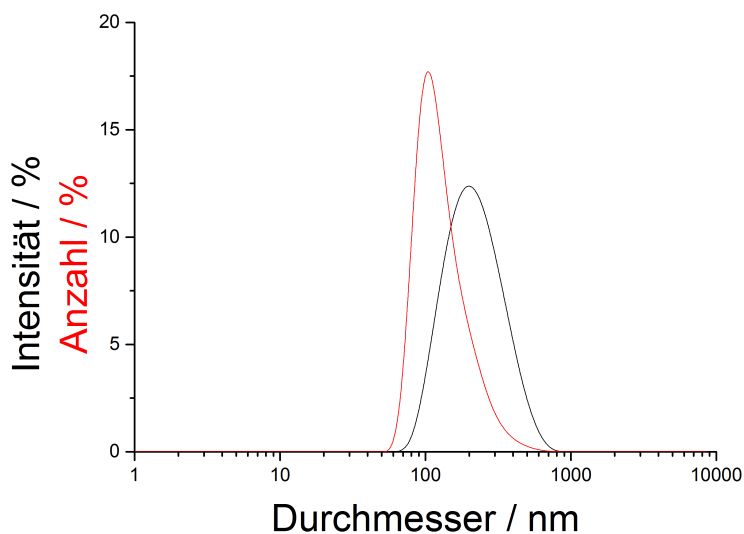


Abbildung 4.18: Mittels dynamischer Lichtstreuung ermittelte Anzahl- (rot) und Intensitäts-gewichtete Größenverteilung (schwarz) von Ostim, das mit verzweigtem Polyethylenimin stabilisiert wurde.

tätsindex betrug 0,16. Der mittlere Durchmesser lag bei 197 nm, das Maximum der Anzahl-gewichteten Größenverteilung lag bei 106 nm, das Maximum der Intensitäts-gewichteten Größenverteilung lag bei 230 nm.

Der mittels Thermogravimetrie bestimmte Polymergehalt betrug etwa 5,8 % (Abbildung 4.19).

Die Partikel weisen eine hohe DNA-Adsorptionskapazität verglichen mit den anderen ver-

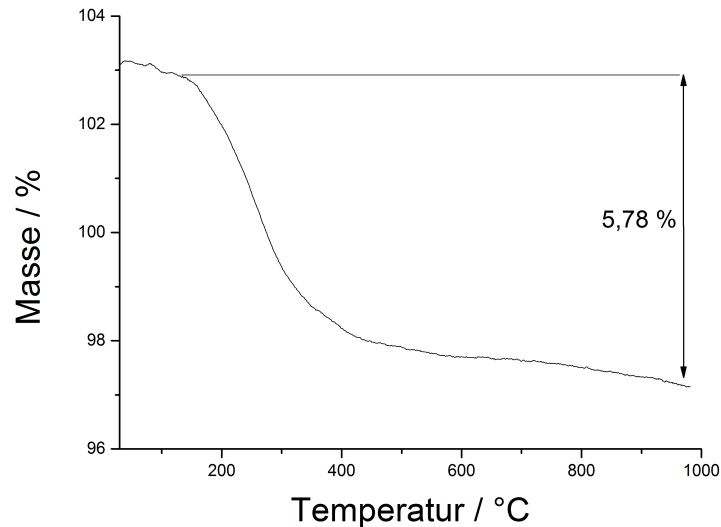


Abbildung 4.19: Mittels Thermogravimetrie bestimmter Polymergehalt von PEI-stabilisierten Ostimpartikeln.

wendeten Polymeren auf. In Abbildung 4.20 ist die Umladungskurve mit den zugehörigen mittleren hydrodynamischen Durchmessern und Polydispersitätsindizes dargestellt. Die Partikel sind ohne DNA-Zugabe aufgrund der PEI-Stabilisierung deutlich positiv geladen. Bereits die Zugabe von 10 µg DNA zu 300 µg Calciumphosphat führt zu einer deutlichen Abnahme des ζ-Potentials auf etwa 30 mV. Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Polymeren tritt bei weiterer Zugabe von DNA ein schwächerer Abfall des ζ-Potentials auf. Im Rahmen der Fehlergenauigkeit ist kein Unterschied bis zu einer Zugabe von 40 µg zu erkennen. Die Zugabe einer höheren DNA Menge führt zu einem Ladungsausgleich, der zu einer deutlichen Aggregation führt. Bereits bevor es zu diesem Ladungsausgleich kommt, kommt es zu einer Größenzunahme der Partikel in Dispersion. Die Zugabe von 30 µg DNA zu 300 µg Calciumphosphat führt zu Partikeln, die mit einem mittleren Durchmesser von 400 nm doppelt so groß sind wie die ursprünglichen Partikel ohne DNA-Zugabe. Mit einem Polydispersitätsindex von etwa 0,4 kann diese Dispersion nicht mehr als monodispers bezeichnet werden. Die kritische DNA-Menge beträgt für die mit verzweigtem Polyethylenimin stabilisierten Calciumphosphat-Partikel

$$\frac{20 \mu\text{g}_{\text{DNA}}}{300 \mu\text{g}_{\text{Ostim}}} = 66 \mu\text{g}_{\text{DNA}} \text{ mg}_{\text{Ostim}}^{-1}. \quad (4.19)$$

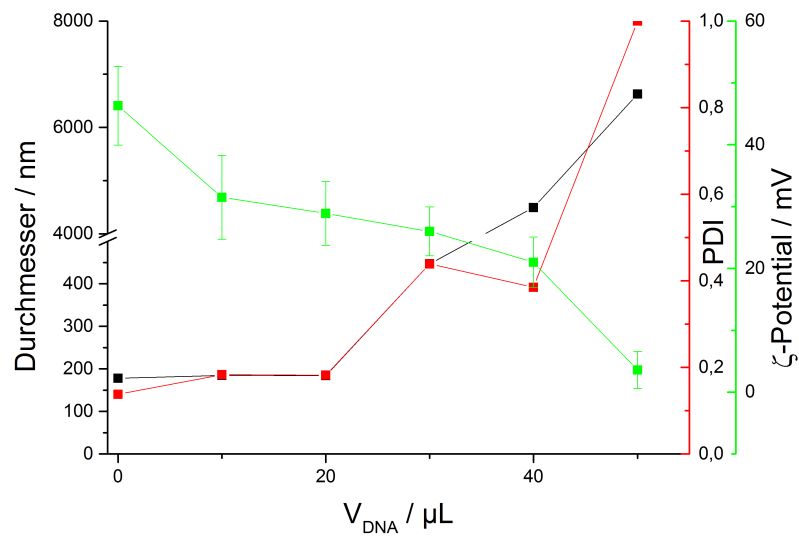


Abbildung 4.20: ζ -Potentiale (grün), Intensitäts-gewichtete hydrodynamische Durchmesser (schwarz) und Polydispersitätsindices (rot) von PEI-stabilisiertem Ostim nach Zugabe unterschiedlicher Mengen DNA.

4.1.9 Stabilisierung von Ostim mit Polyethylenimin ($M_W=750$ kDa)

Das verwendete Polyethylenimin hatte mit 750 kDa die höchste molare Masse von allen verwendeten Polymeren. Die Monomereinheit ist in Abbildung 4.13 dargestellt. In Abbildung 4.21 sind die Anzahl- und Intensitäts-gewichteten Größenverteilungen der Partikel abgebildet. Der mittlere Durchmesser lag bei 206 nm, der Polydispersitätsindex betrug 0,18, so dass die Dispersion als monodispers angesehen werden kann. Das Maximum der Intensitäts-gewichteten Größenverteilung betrug 238 nm. Die Standardabweichung war mit ± 106 nm sehr hoch. Das Maximum der Anzahl-gewichteten Größenverteilung lag bei 106 nm. Das ζ -Potential betrug 36 ± 6 mV. Der durch Thermogravimetrie unter einer

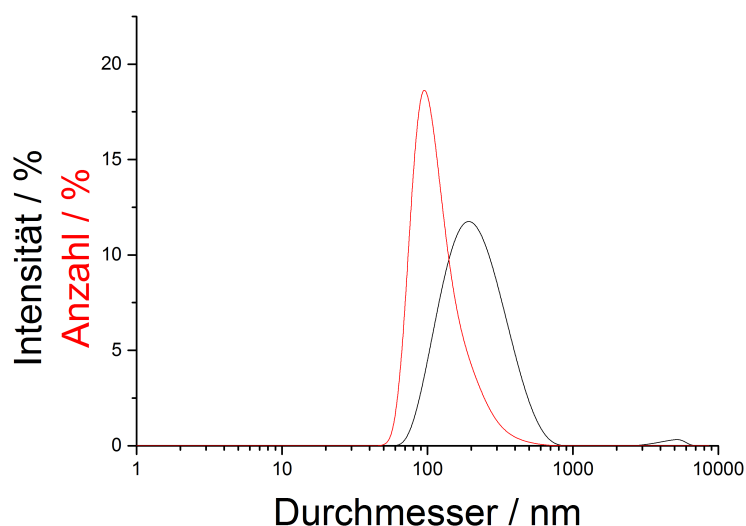


Abbildung 4.21: Intensitäts-gewichtete (schwarz) und Anzahl-gewichtete (rot) Größenverteilung von Ostim nach Stabilisierung mit langkettigem linearem Polyethylenimin ($M_W = 750$ kDa).

dynamischen Sauerstoffatmosphäre bestimmte Polymeranteil betrug 3,6%. Das zugehörige Thermogramm ist in Abbildung 4.22 dargestellt. Die Ergebnisse der Untersuchung zur DNA-Beladungskapazität sind in Abbildung 4.23 dargestellt. Es ist eine sehr gute Übereinstimmung im Verlauf des mittleren Durchmessers und dem Verlauf des Polydispersitätsindex in Abhängigkeit von der zugegebenen DNA-Menge zu erkennen. Bei der Zugabe von 20 μg DNA zu 300 μg Calciumphosphat kommt es zu einer Aggregation der Partikel. Der Polydispersitätsindex steigt auf ca. 0,5, so dass keine genaue Aussage über die Größenverteilung getroffen werden kann. Der mittlere Durchmesser hat einen fast viermal so hohen Wert wie ohne DNA-Zugabe. Bei einer weiteren Zugabe an DNA kommt es zu

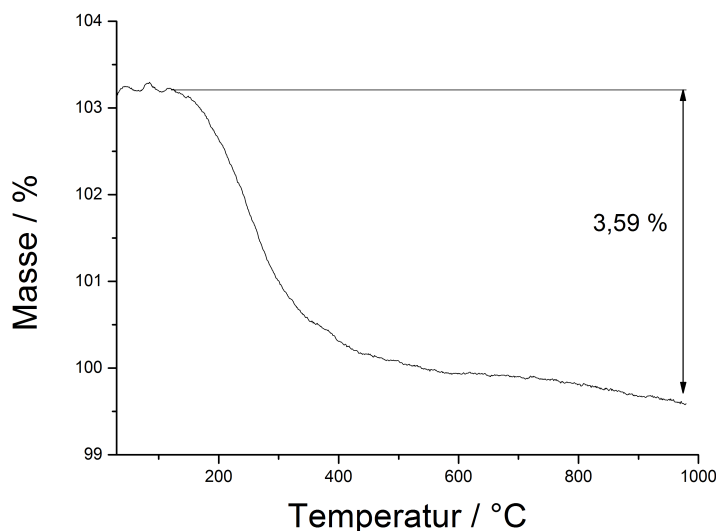


Abbildung 4.22: Masseverlust von PEI-stabilisiertem Ostim durch Oxidation.

einer Umladung der Partikel. Das ζ -Potential fällt auf etwa -15 mV ab und ändert sich durch eine weitere Zugabe an DNA nicht. Die kritische DNA-Menge liegt bei

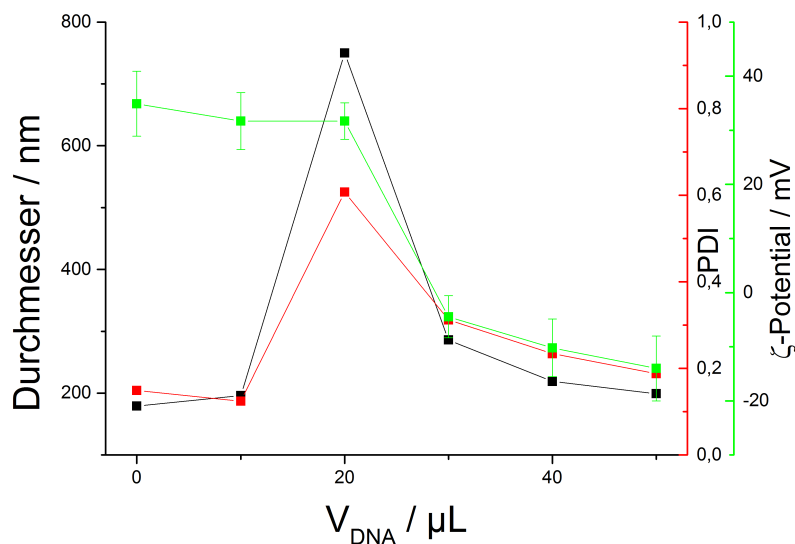


Abbildung 4.23: Umladungskurve von PEI-stabilisiertem Ostim (grün) mit den zugehörigen hydrodynamischen Durchmessern (schwarz) und den Polydispersitätsindices (rot).

$$\frac{10 \mu\text{g}_{\text{DNA}}}{300 \mu\text{g}_{\text{Ostim}}} = 33 \mu\text{g}_{\text{DNA}} \text{ mg}_{\text{Ostim}}^{-1}. \quad (4.20)$$

4.1.10 Stabilisierung von Ostim mit PDADMAC

Bei Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC) handelt es sich um ein Polykation mit einem quartären Ammoniumsalz. Das Polymer findet in der Industrie Anwendung als Flockungsmittel. ^[135,136]

Die Struktur ist in Abbildung 4.24 dargestellt. Die Ostim-Partikel mit einer PDADMAC-

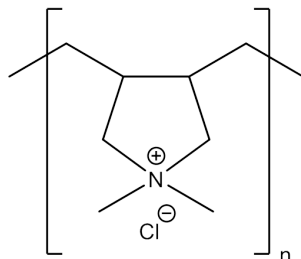


Abbildung 4.24: Monomereinheit von PDADMAC.

Funktionalisierung wiesen einen durchschnittlichen hydrodynamischen Durchmesser von 163 nm auf. Das Maximum der Intensitäts-gewichteten Größenverteilung lag bei 186 nm, das Maximum der Anzahl-gewichteten Größenverteilung lag bei 91 nm. Mit einem Polydispersitätsindex von 0,12 handelt es sich um ein monodisperses System. Das ζ -Potential lag bei 29 ± 10 mV, so dass es sich um elektrostatisch stabilisierte Partikel handelt.

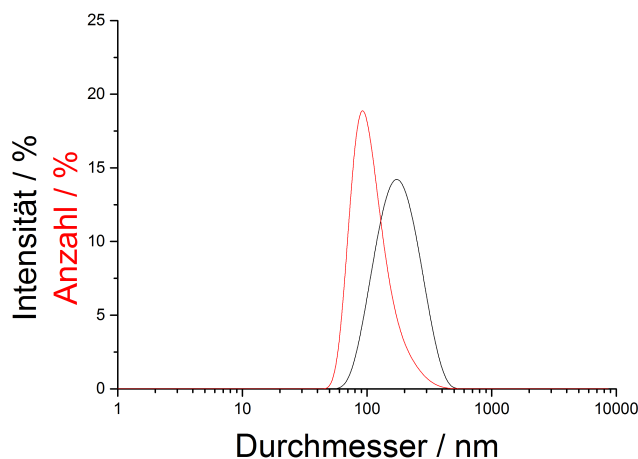


Abbildung 4.25: Größenverteilung von PDADMAC-stabilisiertem Ostim.

Der Polymergehalt wurde mittels Thermogravimetrie bestimmt. Das Thermogramm nach Subtraktion einer Leermessung zur Reduzierung des Messfehlers durch thermischen Auftrieb während der Messung ist in Abbildung 4.26 dargestellt. Der Polymeranteil lag bei

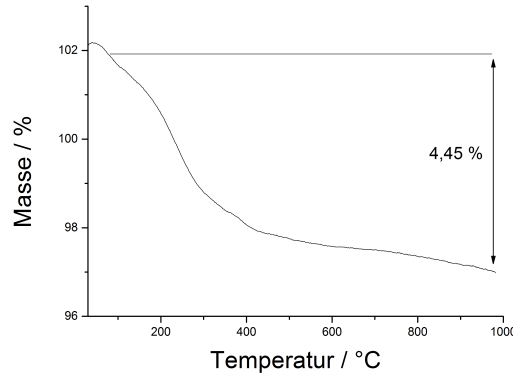


Abbildung 4.26: Bestimmung des Polymergehaltes von PDADMAC-stabilisiertem Ostim mittels thermogravimetrischer Analyse.

4,45 %. Bei der Bestimmung der DNA-Beladungskapazität (Abbildung 4.27) fällt auf, dass diese sehr gering ist. Bereits die Zugabe von 10 μg DNA zu 300 μg Calciumphosphat führt zu einer vollständigen Umladung der Partikel. Bei dieser Menge lag ein polydisperses System mit einem Polydispersitätsindex von 0,9 vor. Bei einer höheren Zugabe von DNA lagen monodisperse Partikel vor, deren mittlere Durchmesser mit dem Durchmesser vor der DNA-Zugabe vergleichbar waren. Die kritische DNA-Menge liegt bei etwa

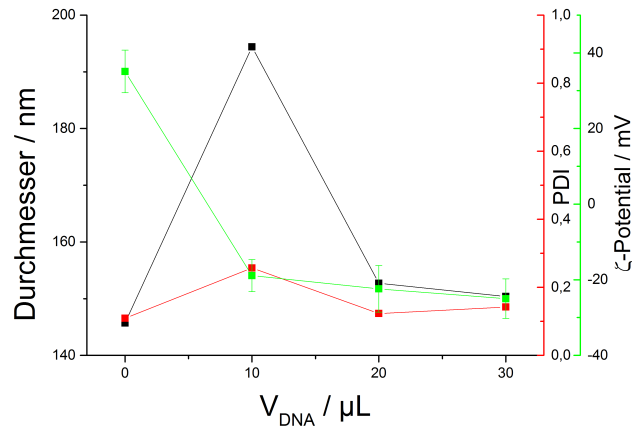


Abbildung 4.27: ζ -Potentiale (grün), hydrodynamische Durchmesser (schwarz) und Polydispersitätsindices (rot) von PDADMAC-stabilisiertem Ostim nach Zugabe unterschiedlicher Mengen DNA.

$$\frac{5 \mu\text{g}_{\text{DNA}}}{300 \mu\text{g}_{\text{Ostim}}} = 17 \mu\text{g}_{\text{DNA}} \text{ mg}_{\text{Ostim}}^{-1}. \quad (4.21)$$

4.1.11 Stabilisierung von Ostim mit Poly- α -Lysin

Poly-L-Lysin ist das Homopolymer der essentiellen Aminosäure Lysin. Eine Peptidbindung kann entweder mit dem Amin der Aminosäuregruppe oder mit dem Amin am Aminosäurerest erfolgen. Die Verknüpfung mit dem Amin der Aminosäure-Funktion führt zum Poly- α -Lysin (Abbildung 4.28). Dieses findet Anwendung in der Beschichtung von Zellkultur-Gefäßen.^[137]

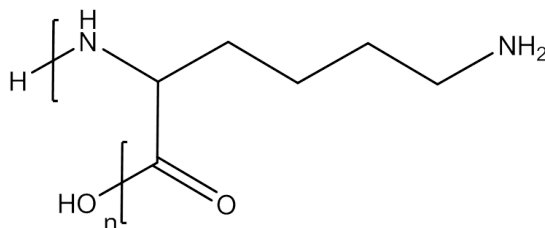


Abbildung 4.28: Strukturformel von Poly- α -Lysin.

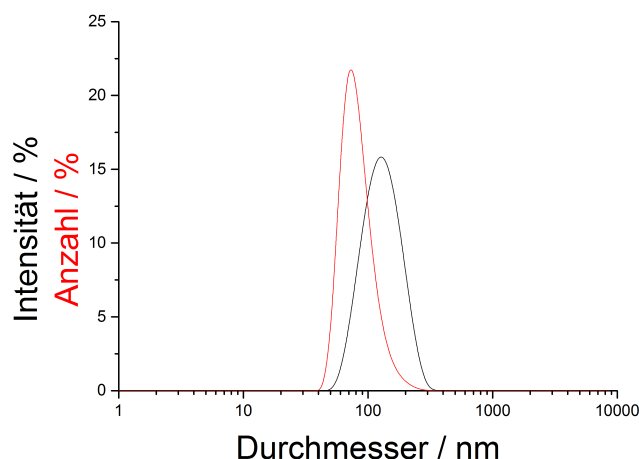


Abbildung 4.29: Mittels dynamischer Lichtstreuung ermittelte Größenverteilung von α -Lysin-stabilisiertem Ostim.

Die Partikel weisen mit 70 nm eine sehr geringe Anzahl-gewichtete Größe auf. Hierbei ist zu beachten, dass bei der dynamischen Lichtstreuung die Intensitäts-gewichtete Größe gemessen wird. Aus diesen Daten erfolgt eine automatische Berechnung der Anzahl-gewichteten Größe. Diese liegt für die Partikel bei 134 nm.

Die Dispersion kann mit einem Polydispersitätsindex von 0,10 als monodispers angesehen werden. Die Partikel wiesen ein ζ -Potential von 31 ± 8 mV auf. Die Größenverteilungen sind in Abbildung 4.29 dargestellt.

Der auf den Partikeln adsorbierte Polymeranteil wurde mittels Thermogravimetrie ermittelt. In Abbildung 4.30 ist die Massenänderung der mit Poly- α -Lysin stabilisierten Partikel in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Der Polymeranteil beträgt ungefähr 5,8 %.

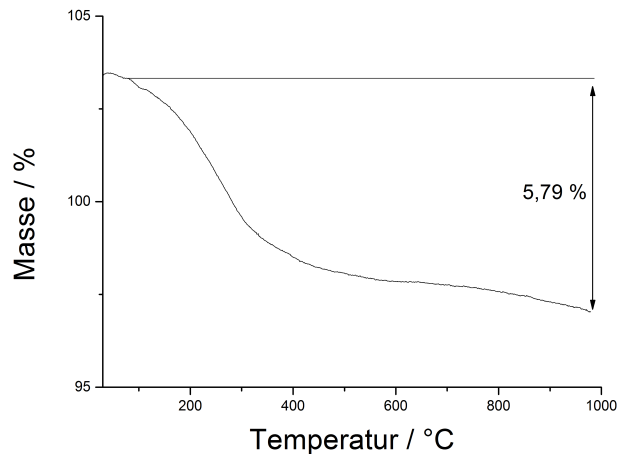


Abbildung 4.30: Mittels Thermogravimetrie ermittelter Polymeranteil von Poly- α -Lysin stabilisiertem Ostim.

Zur Bestimmung der DNA-Adsorptionskapazität, bei der die Partikel monodispers mit einem positiven ζ -Potential vorliegen, wurden unterschiedliche Mengen DNA zu der Dispersion gegeben und eine Charakterisierung mit dynamischer Lichtstreuung und Messung des ζ -Potentials durchgeführt. Die Ergebnisse der Beladungsexperimente sind in Abbildung 4.31 dargestellt. Bereits bei der Zugabe von 10 μg DNA zu der Dispersion kommt es zu einem deutlichen Abfall des ζ -Potentials auf 20 mV. Die Zugabe eines höheren Anteils DNA führt zu einer Umladung. Die Zugabe von 20 μg DNA zu 300 μg Calciumphosphat führt zu einer vollständigen Umladung der Partikel, bei einer höheren Zugabe ist keine Änderung des ζ -Potentials mehr zu beobachten. Die maximale DNA-Menge, die zugegeben werden kann, damit die Partikel monodispers und mit einem positiven ζ -Potential vorliegen, beträgt

$$\frac{10 \mu\text{g}_{\text{DNA}}}{300 \mu\text{g}_{\text{Ostim}}} = 33 \text{ mg}_{\text{DNA}} \text{ g}^{-1}_{\text{Ostim}}. \quad (4.22)$$

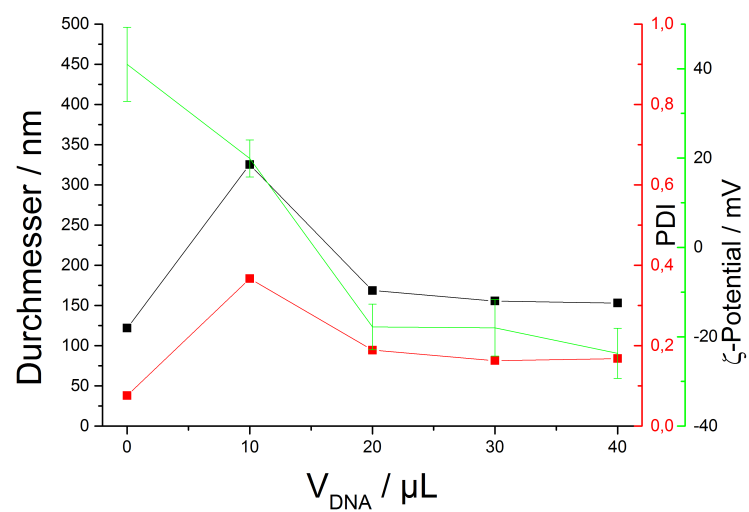


Abbildung 4.31: Durchmesser (schwarz), ζ -Potentiale (grün) und Polydispersitätsindices von Poly- α -Lysin stabilisiertem Ostim nach Zugabe unterschiedlicher Mengen DNA.

4.1.12 Stabilisierung von Ostim mit Poly- ϵ -Lysin

Poly- ϵ -Lysin wird biotechnologisch gewonnen. Anwendung findet es unter Anderem als Konservierungsmittel. Es besteht aus 25-35 Lysineinheiten.^[138] Die Struktur ist in Abbildung 4.32 abgebildet. Nach Zugabe von Poly- ϵ -Lysin, Ultraschall und Reinigung

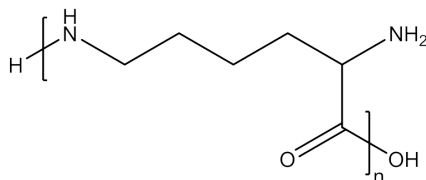


Abbildung 4.32: Strukturformel der Monomereinheit von Poly- ϵ -Lysin.

wurden Partikel mit einer mittleren Größe von 186 nm erhalten. Die Größenverteilungen sind in Abbildung 4.33 zu sehen. Das Maximum der Intensitäts-gewichteten Größenver-

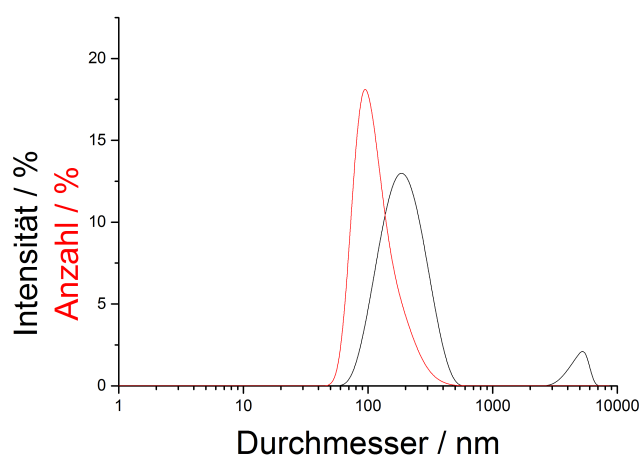


Abbildung 4.33: Anzahl- und Intensitäts-gewichtete Größenverteilung von Poly- ϵ -Lysin.

teilung lag bei 200 nm, die Anzahl-gewichtete Größenverteilung hatte das Maximum bei 91 nm. Die Partikel waren mit einem Polydispersitätsindex von 0,10 monodispers. Die Partikel waren mit einem deutlich positiven ζ -Potential von 44 ± 11 mV elektrostatisch stabilisiert. Die thermogravimetrische Analyse lieferte nach Subtraktion einer Leermessung einen Polymeranteil von 4,5 %. Das Thermogramm ist in Abbildung 4.34 zu sehen. Auffallend ist der Masseverlust im Temperaturbereich bis etwa 130 °C, der auf Restfeuchte zurückzuführen ist. Die mittleren Durchmesser, ζ -Potentiale und Polydispersitätsindices nach Zugabe unterschiedlicher Volumina einer wässrigen DNA-Lösung mit einer Massenkonzentration von 1 g L^{-1} sind in Abbildung 4.35 zu sehen. Die maximale DNA-Menge,

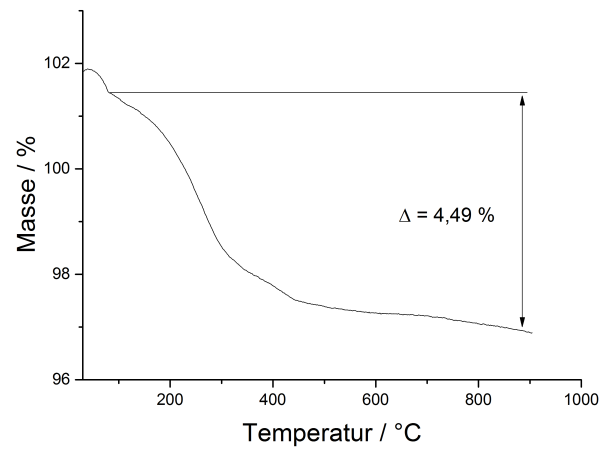


Abbildung 4.34: Thermogramm von Poly- ϵ -stabilisiertem Ostim.

die der Dispersion zugegeben werden kann, ohne dass die Partikel agglomerieren oder umgeladen werden, liegt bei

$$\frac{10 \mu\text{g}_{\text{DNA}}}{300 \mu\text{g}_{\text{Ostim}}} = 33 \mu\text{g}_{\text{DNA}} \text{ mg}_{\text{Ostim}}^{-1}. \quad (4.23)$$

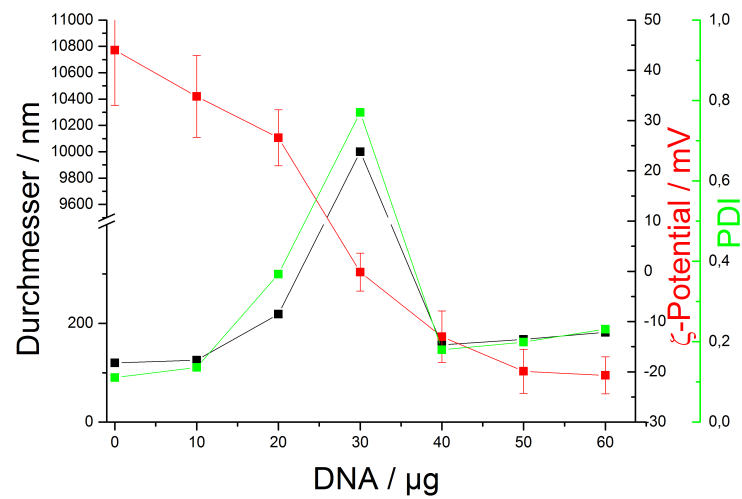


Abbildung 4.35: Mittlerer Durchmesser (schwarz), ζ -Potential (grün) und Polydispersitätsindex (rot) von Poly- ϵ -Lysin stabilisiertem Ostim in Abhängigkeit der zugegebenen DNA-Menge.

4.1.13 Transfektion mit DNA-dotiertem Calciumphosphat

Ausgehend von den Umladungsexperimenten zur Adsorptionskapazität von DNA wurden Ostimpartikel mit den in den Kapiteln 4.1.5 - 4.1.12 untersuchten kationischen Polyelektrolyten stabilisiert. Anschließend wurden diese Partikel mit EGFP-kodierender DNA dotiert. Hierzu wurde je 50 μL der Dispersionen mit 25000 HeLa-Zellen in 500 μL Zell-Medium versetzt. Dies entspricht einer Partikelkonzentration von $7,2 \cdot 10^{10}$ Partikel well^{-1} bzw. $2,88 \cdot 10^6$ Partikel Zelle^{-1} .

Die Proben wurden licht- und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Transfektionseffizienz wurde aus dem Verhältnis von fluoreszierenden zu nichtfluoreszierenden Zellen nach Gleichung 5.2 berechnet. Hierzu wurden $n = 3$ Bilder ausgezählt. In den Proben, die mit PAH-stabilisiertem und DNA dotiertem Calciumphosphat transfiziert wurden, wurden nur in je einem Bild fluoreszierende Zellen beobachtet. Daher wird für diese Proben keine Standardabweichung angegeben. Die mit Poly- ϵ -Lysin stabilisierten Partikel zeigten keine Transfektion und sind deshalb nicht aufgeführt. Die experimentellen Arbeiten wurden von Frau M.Sc. Kozlova durchgeführt.

In Abbildung 4.36 sind 3 exemplarische Fluoreszenzaufnahmen abgebildet. Hier zeigt sich ein generelles Problem für die Auswertung. In allen drei Bildern sind stark fluoreszierende Zellen zu erkennen. In Abbildung A sind zusätzlich zu den stark fluoreszierenden Zellen noch Zellen mit einer schwächeren Fluoreszenzintensität in der unteren Bildhälfte zu erkennen.

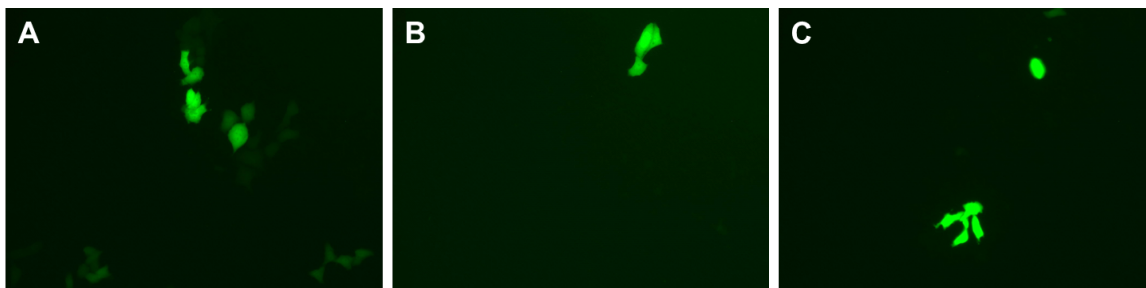


Abbildung 4.36: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen, die mit PEI ($M_W = 25$ kDa) (A), PEI ($M_W = 2$ kDa) (B) und α -PLL (C) stabilisiertem und EGFP-kodierender DNA dotiertem Calciumphosphat transfiziert wurden.

Die Transfektionsergebnisse sind in Abbildung 4.37 graphisch dargestellt. Die mit verzweigtem PEI stabilisierten Partikel haben die höchste Transfektionseffizienz mit $4,6 \pm 1,6\%$ im Rahmen der Fehlergenauigkeit ist jedoch kein Unterschied zu den anderen untersuchten Systemen zu erkennen. Eine Ausnahme bilden die mit Polyallylaminhydrochlorid und

Poly- ϵ -Lysin stabilisierten Partikel, bei denen eine Transfektionseffizienz von null bzw. nahezu null beobachtet wurde. Eine Kontrollprobe, die mit Lipofectamin transfiziert wurde, zeigte mit 74 ± 26 % eine erheblich höhere Transfektionseffizienz als alle selbst synthetisierten Systeme. Die Transfektionseffizienzen sind mit denen aus der Literatur vergleichbar.

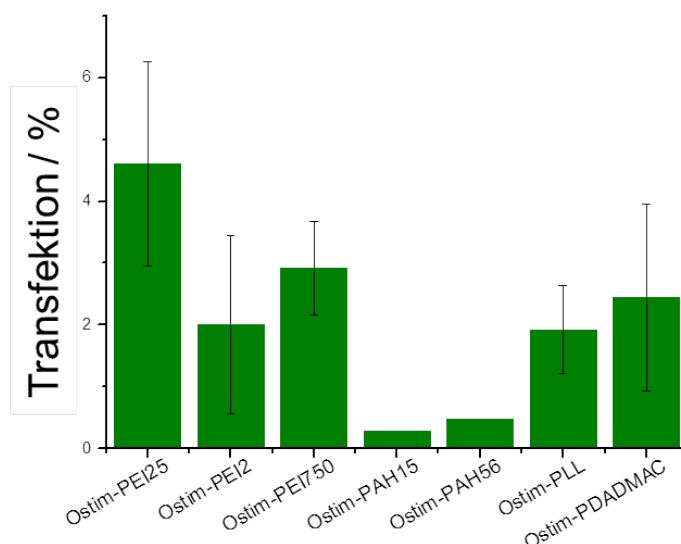


Abbildung 4.37: Transfektionseffizienzen von HeLa-Zellen mit Ostim, das mit kationischen Polymeren stabilisiert und mit DNA dotiert wurde.

KLESING *et al.* konnten mit Ostim, das mit verzweigtem Polyethylenimin stabilisiert und mit DNA dotiert war, Transfektionseffizienzen von ca. 7 ± 3 % erreichen.^[131] Diese Werte stimmen im Rahmen der Fehlergrenzen mit den in der Arbeit erreichten überein.

MINIGO nutzte Polystyrolpartikel, die mit Poly- α -Lysin beschichtet wurden, als Träger für DNA.^[139] Es wurden *in vitro*-Transfektionen mit EGFP-kodierender DNA an unterschiedlichen Zellen mit unterschiedlich großen Partikeln durchgeführt. Die Transfektionseffizienzen lagen zwischen 2 % und 20 %, je nach verwendeten Zellen.

Es konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit kein Polymer gefunden werden, das nach Aufbringen auf Calciumphosphat zu einer besseren Transfektionseffizienz als verzweigtes Polyethylenimin mit einer molaren Masse von 25000 Da führt. Die zu den Transfektionsexperimenten zugehörigen Zellvitalitäten, bezogen auf eine nicht-transfizierte Probe, sind in Abbildung 4.38 dargestellt. Die Kontrolle, bei der mit Lipofectamin transfiziert wurde, ist nicht aufgeführt. Mit einer Zell-Vitalität von 72 ± 26 % kann die verwendete Lipofectamin-Menge als nicht toxisch angesehen werden. Neben der Art des Polyelektrolyten und seiner Konzentration spielt die verwendete Zelllinie eine entscheidende Rolle für die Toxizität.^[140] Weiterhin unterscheidet sich die Toxizität je nach aufgenommener Spezies. So weisen freie

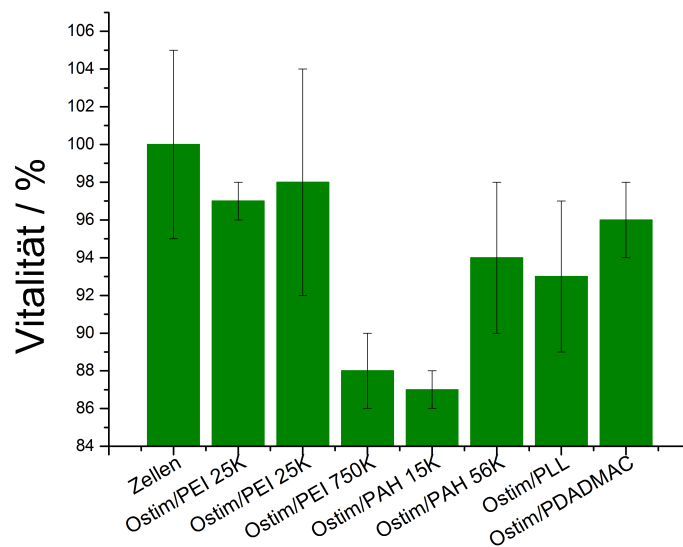


Abbildung 4.38: Vitalitäten von Zellen, die mit Polymer-stabilisiertem und DNA dotiertem Calciumphosphat transfiziert wurden.

Polykationen allgemein eine höhere Zytotoxizität auf als auf Partikeloberflächen adsorbierte Polykationen.^[141] Für freie Polykationen gilt Polyethylenimin als ähnlich toxisch wie Poly- α -Lysin, während PDADMAC weniger toxisch ist.^[141]

Die meisten im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Systeme waren nicht toxisch. Die mit langkettigem, linearem Polyethylenimin ($M_W = 750$ kDa) und mit Polyallylaminhydrochlorid ($M_W = 15$ kDa) stabilisierten und mit DNA dotierten Calciumphosphate zeigten eine geringere Zellvitalität. Die niedrigere Zellvitalität der mit langkettigem PEI stabilisierten Partikel ist auf die höhere molare Masse zurückzuführen. Für Polyethylenimin ist eine von der molaren Masse abhängige Toxizität bekannt. Eine große Kettenlänge führt zu einer höheren Toxizität.^[142]

4.1.14 Zusammenfassung

Ostim wurde mit unterschiedlichen kationischen Polymeren stabilisiert. In Tabelle 4.2 sind die Intensitäts- und Anzahl-gewichteten Maxima der Größenverteilungen sowie die ζ -Potentiale aufgelistet. Alle Dispersionen wiesen ein deutlich positives ζ -Potential auf,

Tabelle 4.2: Hydrodynamische Durchmesser und ζ -Potentiale von Ostim nach Stabilisierung mit kationischen Polymeren

Polymer	M_W / kDa	D (Intensität) / nm	D (Anzahl) / nm	PDI	ζ -Potential / mV	Standardabweichung / mV
PAH	15	230	91	0,182	35	5
PAH	56	185	91	0,14	46	6
PEI	2	196	106	0,13	35	16
PEI	25	230	106	0,16	43	10
PEI	750	238	106	0,18	36	6
PDADMAC	100	186	91	0,132	29	10
α PLL	15	134	70	0,10	31	8
ϵ PLL	3,5	200	91	0,10	44	11

so dass von einer elektrosterischen Stabilisierung durch die eingesetzten Polyelektrolyten ausgegangen werden kann. Die Polydispersitätsindices deuteten in allen untersuchten Systemen auf monodisperse Größenverteilungen der Calciumphosphate nach der Stabilisierung hin. Aus den ermittelten Größenverteilungen kann davon ausgegangen werden, dass es in den Systemen zu keiner Aggregation gekommen ist und die Calciumphosphate als einzelne Stäbchen in Dispersion vorliegen.

Die ermittelten ζ -Potentiale der Partikel sind im Rahmen der Fehler größer als 30 mV. Sie sind somit in wässriger Dispersion stabil.^[143] Da durch die aufgebrauchten Polyelektrolyten nicht nur eine elektrostatische sondern auch eine sterische Stabilisierung erzielt wird, kann von stabilisierten Systemen ausgegangen werden.

Die ermittelten Durchmesser liegen zwischen 130 nm und 240 nm. Hierbei ist zu beachten, dass es sich bei Ostim um Nanostäbchen handelt. Es konnte gezeigt werden, dass sich alle eingesetzten Polymere zur kolloidalen Stabilisierung von Ostim eignen. Die Quantifizierung der auf den Partikeln adsorbierten Polymermenge lieferte Polymeranteile zwischen 8,1 % und 3,31 % (Tabelle 4.3). Ein Zusammenhang zwischen der adsorbierten Polymermenge und der mittleren molaren Masse ist nicht zu erkennen. Es wurden zwei lineare Polyethylenimine zur Stabilisierung des Calciumphosphats eingesetzt. Obwohl das hochmolekulare Polymer eine 375-mal höhere Molmasse als das kurzkettige Polymer hat, unterscheiden

sich die Polymermengen, die durch Thermogravimetrie bestimmt wurden, nur um etwa 6 %. KLESING ermittelte einen Polymergehalt von 6,1 % für Calciumphosphatstäbchen, die mit verzweigtem Polyethylenimin stabilisiert wurden.^[132] Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem in dieser Arbeit ermittelten Wert von 5,78 % überein. Der Großteil der unter-

Tabelle 4.3: Polymeranteil, DNA-Beladungskapazität, Transfektionseffizienz und Zellvitalität für Polymer-stabilisiertes Ostim

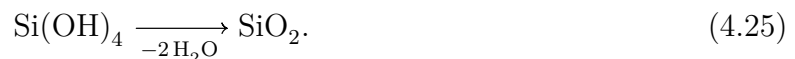
Polymer	M_W / kDa	Polymeranteil / %	DNA-Beladung / $\mu\text{g mg}^{-1}$	Transfektionseffizienz / %	Vitalität / %
PAH	15	5,42	66	0,3	87 ± 1
PAH	56	8,12	133	0,5	94 ± 4
PEI	2	3,38	33	$2 \pm 1,4$	97 ± 1
PEI	25	5,78	66	$4,6 \pm 1,6$	98 ± 6
PEI	750	3,59	33	$2,9 \pm 0,8$	88 ± 2
PDADMAC	100	4,45	17	$2,4 \pm 1,5$	96 ± 2
α PLL	15	5,79	33	$1,9 \pm 0,7$	96 ± 2
ϵ PLL	3,5	4,49	33	–	102 ± 1

suchten Systeme zeigt eine schlechte Transfektionseffizienz. Ein Zusammenhang zwischen der molaren Masse der Polymere und der Zellvitalität ist für die untersuchten Systeme nicht zu erkennen.

4.2 Ostim mit Siliciumdioxid

4.2.1 Einleitung

Die Synthese von Siliciumdioxid-Schichten auf Partikeln ist ein in der Literatur weit verbreitetes Verfahren.^[144–147] Die Darstellung einer Silicaschicht auf Ostimpartikeln erfolgte nach dem STÖBER-Prozess.^[148] Hierbei wird Tetraethoxysilan (TEOS) im basischen pH-Bereich hydrolysiert. Durch die Hydrolyse werden aus dem Kieselsäureester Orthokieselsäure und Ethanol gebildet. Die Kieselsäure kondensiert im nächsten Schritt, und es entsteht Siliciumdioxid.



Lagert sich das TEOS an der Oberfläche von Partikeln an, so kann durch die Kondensationsreaktion eine SiO_2 -Hülle um die Partikel erzeugt werden.^[149,150] Calciumphosphat

ist eine ionische Verbindung, so dass die Oberfläche nicht kovalent funktionalisiert werden kann. Die zur Stabilisierung verwendeten Polymere lassen sich ebenfalls nur eingeschränkt funktionalisieren. Bei einer Funktionalisierung des Polymers, nachdem es auf die Oberfläche der Partikel gebracht wurde, ist besonders auf die Reaktionsbedingungen zu achten. So können etwaige Reaktionen nicht im sauren pH-Bereich durchgeführt werden, um ein Auflösen des Calciumphosphates zu vermeiden. Die Funktionalisierung des Polymers vor der Stabilisierung von Nanopartikeln hat ebenfalls zahlreiche Nachteile. Typischerweise wird bei der Stabilisierung von Nanopartikeln mit einem sehr großen Polymerüberschuss gearbeitet. Nach der Stabilisierung wird das nicht-adsorbierte Polymer durch Zentrifugation oder Dialyse entfernt. Hierdurch geht sehr viel von dem funktionalisierten Polymer verloren. Dies ist besonders bei aufwändigen Kopplungen oder Kopplungen mit teuren Stoffen, wie zum Beispiel Antikörpern, ein großes Problem.

Ein weiterer Nachteil bei der Funktionalisierung des Polymers vor der Stabilisierung liegt in einem möglichen Verlust der Fähigkeit, Kolloide ausreichend stabilisieren zu können. Betrachtet man geladene Polymere, so kommt es zu einer geringeren Anzahl an Ladungsträgern, wenn an die ladungstragenden Gruppen Moleküle gebunden werden. Hierdurch können die später mit dem Polymer stabilisierten Partikel weniger stark elektrostatisch stabilisiert werden. Weiterhin muss die Substanz, mit der das Polymer funktionalisiert wurde, die Reinigungsschritte wie Ultrazentrifugation und anschließende Beschallung mit einem Ultraschalldisperser überstehen, ohne ihre Funktion zu verlieren.

Ein weiteres Problem bei der Funktionalisierung liegt in der geringen Zahl funktioneller Gruppen und verwendbarer Polymere.

Diese Probleme lassen sich reduzieren, wenn die Partikel mit einer Siliciumdioxid-Schicht umhüllt werden und diese Hülle anschließend kovalent modifiziert wird.

Zur Funktionalisierung der Silicatschicht eignet sich eine Silanisierung mit Trialkoxysilanen. Je nach gewünschter Funktionalisierung stehen unterschiedliche Reagenzien zur Verfügung. Für eine Thiolfunktionalisierung eignet sich beispielsweise 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan.^[151,152] Für eine Aminofunktionalisierung lässt sich 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) verwenden,^[153–155] das auch für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Aminofunktionalisierungen benutzt wurde. Die Strukturformel ist in Abbildung 4.39 gezeigt. Die Silanisierung von Oberflächen erfolgt in mehreren Schritten. Als erstes kommt es zu einer Hydrolyse und anschließend zu einer Kondensation.^[156,157]

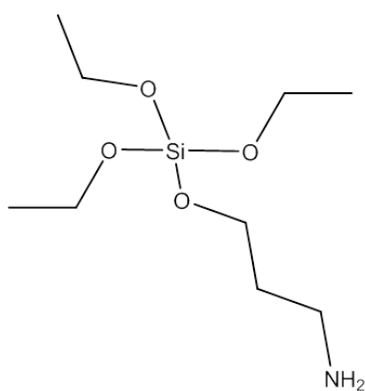


Abbildung 4.39: Struktur von 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan.

4.2.2 Experimenteller Teil

In Anlehnung an KOZLOVA *et al.*^[158] wurde Polyethylenimin (25 kDa) verwendet, um Ostim zu stabilisieren. Es wurden 1 mL einer 6 %-igen Dispersion eingesetzt, was einem Calciumphosphatanteil von 60 mg entspricht. Diese Dispersion wurde mit 4,5 mL Reinstwasser verdünnt, anschließend wurden zur Stabilisierung 4,5 mL einer Polyethyleniminlösung ($c = 2 \text{ g L}^{-1}$, $M_W = 25000 \text{ Da}$) in Reinstwasser zugegeben. Zur besseren Durchmischung wurde ein Ultraschalldisperser (1 min, Amplitude 70 %) verwendet. Die Dispersion wurde 30 Minuten bei 4700 g zentrifugiert und in 10 mL Ethanol unter Zuhilfenahme des Ultraschalldispersers redispersiert. Diese Dispersion wurde mittels dynamischer Lichtstreuung charakterisiert.

5 mL der Dispersion wurden in einen Rundkolben gegeben und mit 45 mL Ethanol verdünnt. Es folgte die Zugabe von 600 μL TEOS und 600 μL einer 30 %-igen NH_3 -Lösung. Das Schema für die Reaktion ist in Abbildung 4.40 dargestellt. Die Dispersion wurde 8

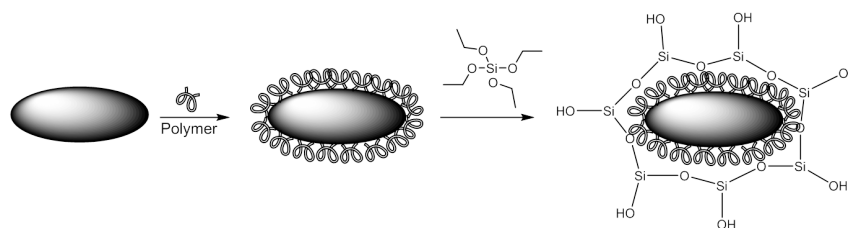


Abbildung 4.40: Schema zum Aufbringen einer SiO_2 -Schicht auf Polymer-stabilisiertes Ostim.

Stunden bei Raumtemperatur gerührt, anschließend erfolgte eine Reinigung mittels Zentrifugation. Die Dispersion wurde in einem Volumen von 50 mL Reinstwasser redispersiert, 25 mL dieser Dispersion wurden erneut zentrifugiert, bei 50 °C getrocknet und mittels IR-Spektroskopie charakterisiert.

Die in Wasser redispersierte Probe wurde mittels dynamischer Lichtstreuung, Messung des ζ -Potentials, Rasterelektronenmikroskopie, Transmissionselektronenmikroskopie und energiedispersiver Röntgenfluoreszenzspektroskopie charakterisiert.

Für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden etwa 20 μL der Dispersion auf einen Aluminium-Träger getropft und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend erfolgte ein Bedampfen mit einer Gold-Palladium-Legierung (80 : 20), um die elektrische Leitfähigkeit zu erhöhen.

Die energiedispersive Röntgenfluoreszenz-Analyse erfolgte als Messung mehrerer Punkte der Probe. Außerdem wurde ein *Mapping* einer 160 μm^2 großen Oberfläche für die Elemente Calcium, Phosphor und Silicium angefertigt. Für die Untersuchungen mittels Rasterelek-

tronenmikroskopie und Röntgenfluoreszenz wurde die gleiche Probe verwendet.

Zur Charakterisierung mittels dynamischer Lichtstreuung bzw. Messung des ζ -Potentials wurde die Dispersion mit Reinstwasser 10-fach verdünnt.

Um die Siliciumdioxid-Schicht weiter zu funktionalisieren, wurde eine Silanisierung mit 3-Aminopropyl-triethoxysilan (APTES) durchgeführt. Hierfür wurden 25 mL der ethanologischen Dispersion mit 300 μ L 3-Aminopropyl-triethoxysilan und 100 μ L einer 30 %-igen NH_4OH -Lösung versetzt und 8 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Dispersion bei 4700 g zentrifugiert und in 25 mL Reinstwasser redispersiert. Hierzu wurde das Zentrifugat 2 Minuten mit einem Ultraschalldisperser behandelt.

Zur Anbindung von FITC wurden 50 μ L einer FITC-Lösung in DMSO (1 g L^{-1}) mit 25 mL der Partikeldispersion versetzt und 15 Stunden bei Raumtemperatur mit einer Schüttelplatte vermischt.

Die Kopplung von FITC erfolgt an Amingruppen (Abbildung 4.41). Daher ist es möglich,

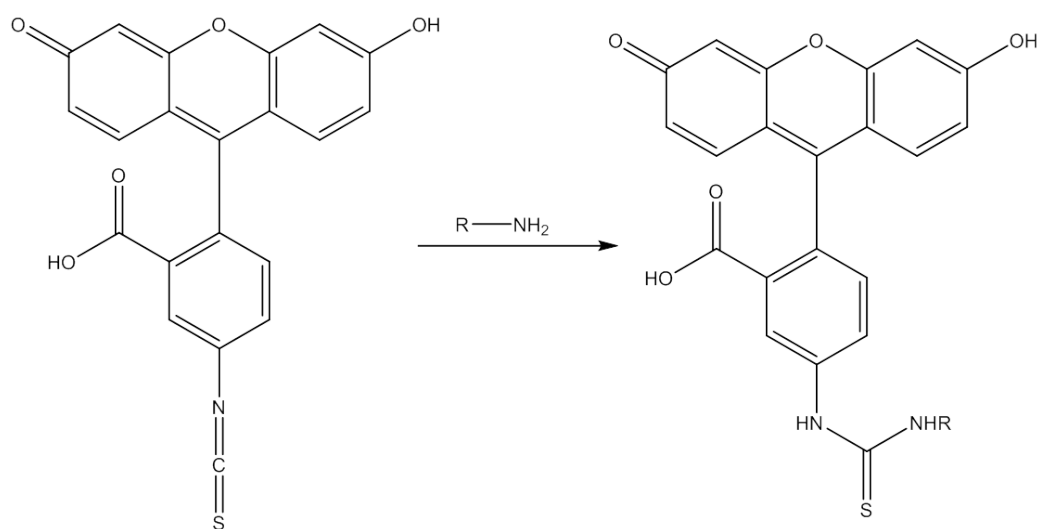


Abbildung 4.41: Reaktion von FITC mit einem primären Amin

dass das FITC an ein Amin des Polyethylenimins koppelt. Um sicherzustellen, dass die Kopplung an das Amin des 3-Aminopropyl-triethoxysilans erfolgt, wurde alternativ das anionische Polymer Polystyrolsulfonat (PSS) zur Stabilisierung von Ostim verwendet, da dieses keine Amingruppe trägt. Die Struktur ist in Abbildung 4.42 dargestellt. Für die Stabilisierung wurden 60 mg Ostim in 1 mL Reinstwasser mit 8 mL Reinstwasser verdünnt und mit 1 mL einer Polystyrolsulfonat-Lösung mit einer Massenkonzentration von 2 g L^{-1} versetzt. Die Dispergierung erfolgte mittels Ultraschalldisperser. Die Dispersion wurde 30 Minuten bei 4700 g zentrifugiert und in 10 mL Ethanol redispersiert.

Anschließend erfolgte eine Silicafunktionalisierung mit TEOS. Hierzu wurden 5 mL der

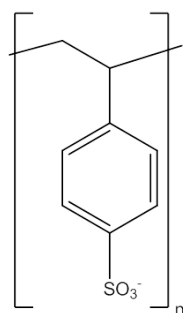


Abbildung 4.42: Struktur der Monomereinheit von Polystyrolsulfonat.

in Ethanol redispersierten Dispersion mit 45 mL Ethanol verdünnt. Es folgte die Zugabe von 600 μL TEOS und 600 μL einer 30 %-igen NH_3 -Lösung. Der Reaktionsansatz wurde 15 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, zentrifugiert und in 50 mL Ethanol redispersiert. Anschließend wurden 25 mL dieser Dispersion mit 300 μL APTES für 7 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde zentrifugiert, in 25 mL Wasser redispersiert und mit einer FITC-Lösung in DMSO (50 μL , $c=1 \text{ g L}^{-1}$) versetzt. Der pH-Wert wurde mit Ammoniak auf 10 eingestellt. Anschließend wurde die Dispersion bei Raumtemperatur mittels Schüttelplatte für 14 Stunden vermischt. Im letzten Schritt erfolgte eine Zentrifugation und ein Dispergieren in Reinstwasser, um das nicht gebundene FITC von der Dispersion zu trennen. Die Dispersionen wurden nach den einzelnen Reaktionsschritten mittels dynamischer Lichtstreuung und durch Messung des ζ -Potentials charakterisiert. Die mit FITC versetzte Dispersion wurde nach Reinigung zusätzlich mittels Rasterelektronenmikroskopie, UV-Vis-Spektroskopie und Fluoreszenzspektroskopie charakterisiert. Sowohl mit den PSS-stabilisierten als auch mit den PEI-stabilisierten Calciumphosphatpartikeln wurden Zell-Aufnahme-Versuche nach der Silicafunktionalisierung mit FITC-Markierung durchgeführt. Hierzu wurden 40 μL der Dispersionen mit 10000 HeLa-Zellen in 500 μL Zellmedium versetzt und für 4 Stunden bei 37 °C in einer 5 %-igen CO_2 -Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, und es erfolgten licht- und fluoreszenzmikroskopische Auswertungen. Die zellbiologischen Arbeiten wurden von Frau M.Sc. Chernousova durchgeführt.

4.2.3 Ergebnisse und Diskussion

Die in Ethanol redispergierten PEI-stabilisierten Ostim-Partikel und die nach Zugabe von TEOS in Reinstwasser redispergierten Partikel wurden mittels dynamischer Lichtstreuung charakterisiert. In Abbildung 4.43 sind die Intensitäts-gewichteten Größenverteilungen aufgetragen. Die mit PEI stabilisierten, in Ethanol dispergierten Ostim-Partikel haben eine durchschnittliche Größe von 155 nm bei einem Polydispersitätsindex von 0,180. Nach dem STÖBER-Prozess und Redispergieren in Wasser weisen die Partikel einen durchschnittlichen Durchmesser von 195 nm bei einem PDI von 0,118 auf. Die PEI-stabilisierten Ostim-Partikel sind in Ethanol redispergierbar. Die Zugabe von TEOS und anschließende Reinigung führt zu keinem Verlust der kolloidalen Stabilität. Die Partikel weisen ei-

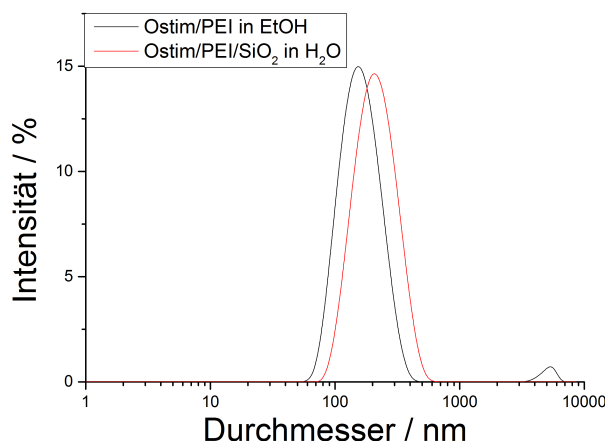


Abbildung 4.43: Dynamische Lichtstreuung von Ostim/PEI-Partikeln in Ethanol (schwarz) und Ostim/PEI/SiO₂ Partikeln in H₂O (rot).

ne monodisperse Größenverteilung auf. Die durchschnittliche Größe beträgt 220 nm. Die Rasterelektronenmikroskopie zeigt eine dichte Schicht aus Ostim-Stäbchen. Eine exemplarische Aufnahme ist in Abbildung 4.44 dargestellt. Die Dispersion ist nach der Reaktion mit TEOS mit einem Polydispersitätsindex von 0,12 monodispers. Die Anzahl- und Intensitäts-gewichteten Größenverteilungen sind in Abbildung 4.45 dargestellt. Das ζ -Potential ist mit 25 ± 6 mV nach der Funktionalisierung mit TEOS deutlich positiv. Zum Nachweis der erfolgreichen Funktionalisierung mit Siliciumdioxid wurde zunächst ein Röntgenfluoreszenzspektrum mit Mikroanalyse während der rasterelektronenmikroskopischen Charakterisierung angefertigt. Dieses ist in Abbildung 4.46 zu sehen. Das Röntgenfluoreszenzspektrum zeigt ein sehr deutliches Signal bei $E = 1,45$ keV, das der K_{α} -Linie von Aluminium aus dem Probenenträger zugeordnet werden kann. Das Kupfer- K_{α} -Signal mit

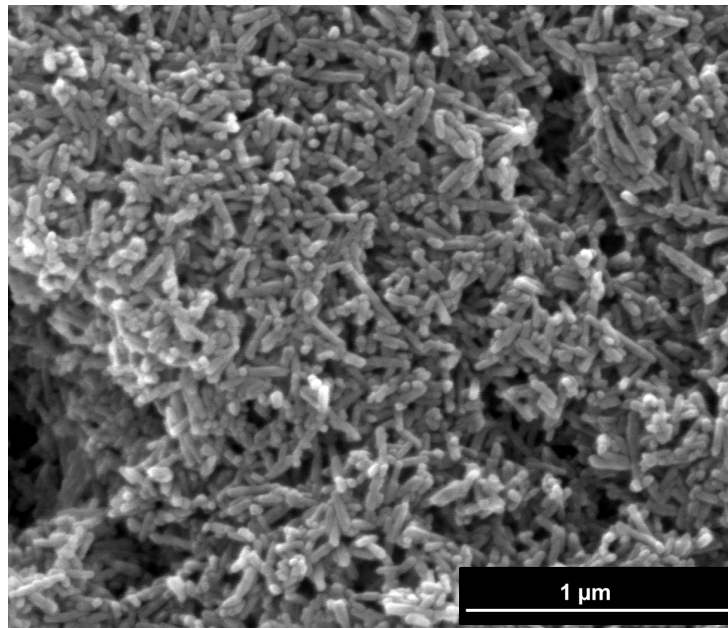


Abbildung 4.44: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von PEI-stabilisierten Ostim-Partikeln nach Zugabe von TEOS und Reinigung mittels Zentrifugation.

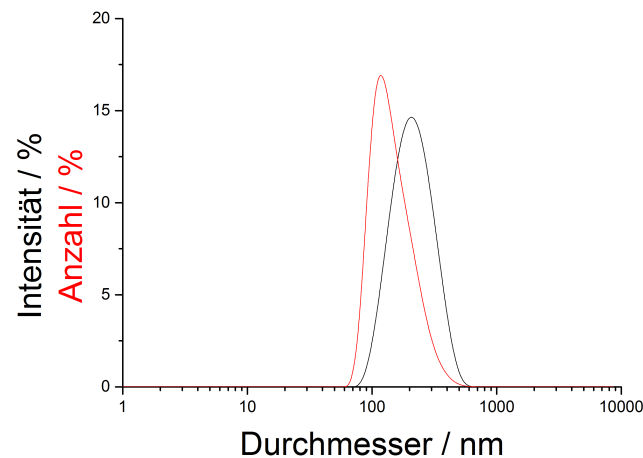


Abbildung 4.45: Anzahl- und Intensitäts-gewichtete Größenverteilung von Polyethylenimin-stabilisiertem Calciumphosphat nach Funktionalisierung mit Siliciumdioxid.

einer Energie von 0,95 keV ist ebenfalls auf den Legierungsbestandteil des Probenträgers zurückzuführen. Die Integration der Signale in Abbildung 4.46 liefert für die Elemente Sauerstoff, Silicium, Phosphor und Calcium einen Silicium-Anteil von etwa 2,6 At-%. Die Zusammensetzung der Probe für die untersuchten Elemente ist in Tabelle 4.4 aufgeführt.

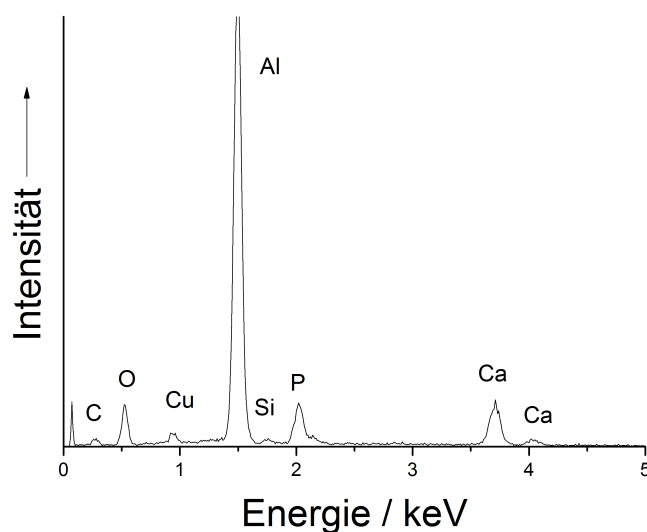


Abbildung 4.46: Röntgenfluoreszenzspektrum von PEI-stabilisierten Ostim-Partikeln nach Zugabe von TEOS und Reinigung mittels Zentrifugation.

Das molare Calcium-zu-Phosphor-Verhältnis beträgt 1,54.

In Abbildung 4.47 ist das Infrarotspektrum der PEI-stabilisierten Ostim-Partikel nach

Tabelle 4.4: Mittels Röntgenfluoreszenz bestimmte Zusammensetzung der mit TEOS versetzten Ostim-Partikel

Element	Anteil / At-%
Sauerstoff	67,9
Silicium	2,6
Phosphor	11,6
Calcium	17,9

Zugabe von TEOS und Zentrifugation zu sehen. In der Vergrößerung ist eine Bande bei einer Wellenzahl von 796 cm^{-1} zu erkennen, die charakteristisch für eine Si—O—Si-Bindung ist. ^[159]

Die Ergebnisse der Flächenanalyse mit Röntgenfluoreszenzanalyse sind in Abbildung 4.48 dargestellt. In der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme erkennt man die Ostim-stäbchen und in dem rechten Bilddrittel eine freie Fläche. Die Untersuchung der Flächen mittels energiedispersiver Röntgenfluoreszenzanalyse für die Elemente Silicium (B), Calcium (C) und Phosphor (D) zeigt eine gute Übereinstimmung der Signalintensitäten und Positionen der Signale für die untersuchten Elemente. Eine hohe Farbintensität zeigt ei-

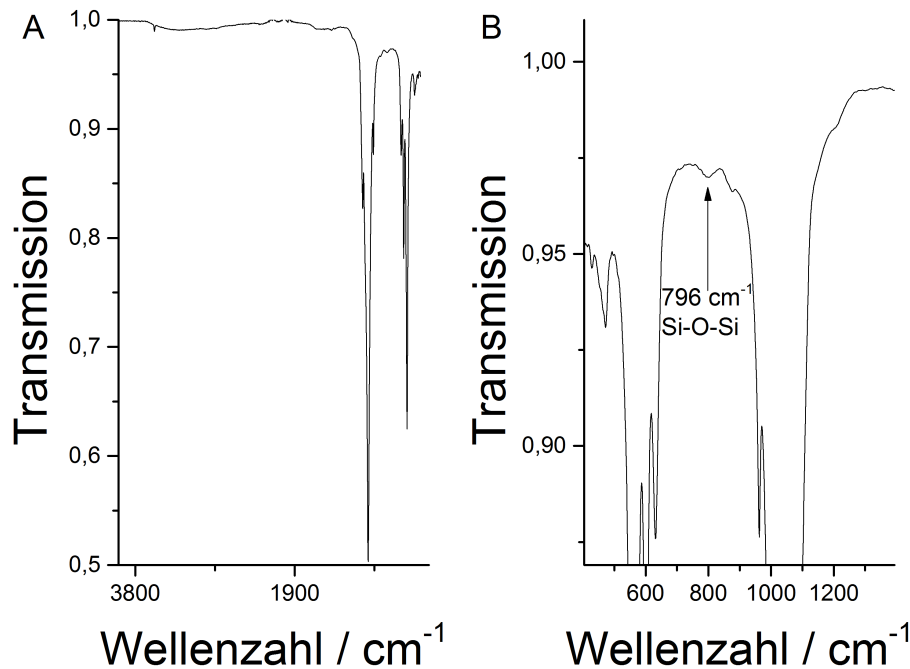


Abbildung 4.47: Infrarotspektrum von Ostim/PEI nach Zugabe von TEOS und Trocknung.

ne hohe Elementkonzentration an. Für Calcium und Phosphor ist eine gute Korrelation zwischen Konzentration und Position zu erkennen. Für Silicium ist ebenfalls eine gute Übereinstimmung von Konzentration mit Position verglichen mit der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme und den Orts-Konzentrationen von Calcium und Phosphor zu erkennen. Im linken Bildteil ist bei jedem Bild eine erhöhte Farbintensität verglichen mit dem rechten Bildrand dargestellt. Somit liegt Silicium an den gleichen Positionen wie Calciumphosphat. Da nur einheitliche stäbchenförmige Partikel zu erkennen sind, kann davon ausgegangen werden, dass das Silicium als Silicatschicht auf den Ostim-Partikeln ist und sich keine kugelförmigen SiO_2 -Partikel gebildet haben.

In Abbildung 4.49 ist eine Detail-Aufnahme von drei Ostimstäbchen nach Silica-Funktionalisierung gezeigt, die mit Transmissionselektronenmikroskopie angefertigt wurde. Ein Kontrastunterschied, der eine äußere Siliciumdioxid-Schicht auf den Stäbchen zeigt, ist nicht zu erkennen.

Eine theoretisch zu erwartende Schichtdicke lässt sich über die Menge der eingesetzten Edukte grob abschätzen. Für die Synthese wurden 600 μL TEOS eingesetzt. Bei einer

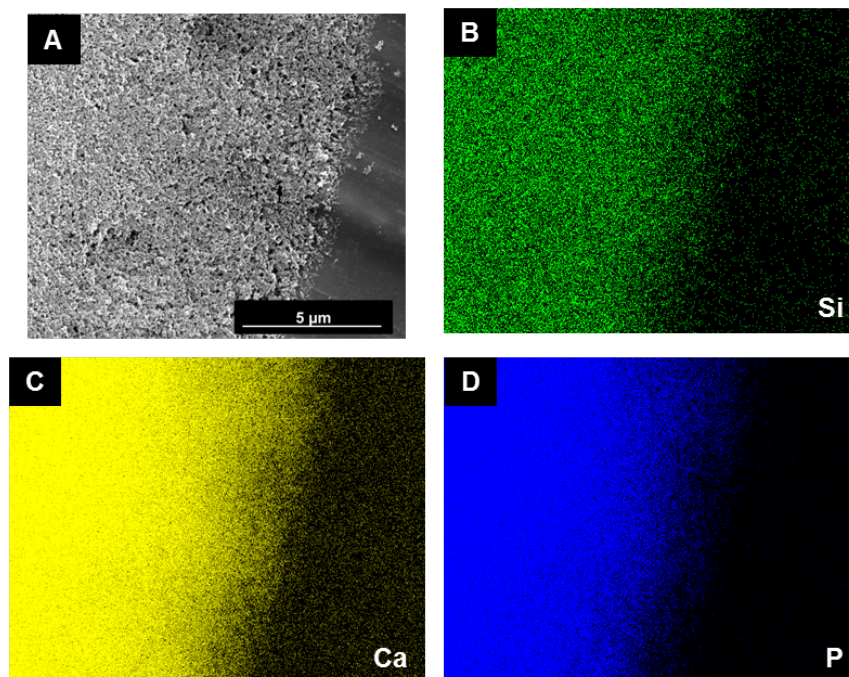


Abbildung 4.48: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer mit SiO_2 funktionalisierten Ostim-Probe (A) mit EDX-Mapping für die Elemente Silicium (B), Calcium (C) und Phosphor (D).

Dichte von $0,94 \text{ g/cm}^3$ ergibt sich eine Masse von

$$\begin{aligned} m &= \rho \cdot V \\ &= 0,94 \text{ g cm}^{-3} \cdot 600 \mu\text{L} \\ &= 0,564 \text{ g.} \end{aligned} \tag{4.26}$$

Der Siliciumgehalt liegt im TEOS bei

$$\begin{aligned} \frac{M_{\text{Si}}}{M_{\text{TEOS}}} &= \frac{28,09 \text{ g mol}^{-1}}{208,32 \text{ g mol}^{-1}} \\ &= 13,5 \%, \end{aligned} \tag{4.27}$$

so dass insgesamt

$$0,564 \text{ g} \cdot 0,135 = 76 \text{ mg} \tag{4.28}$$

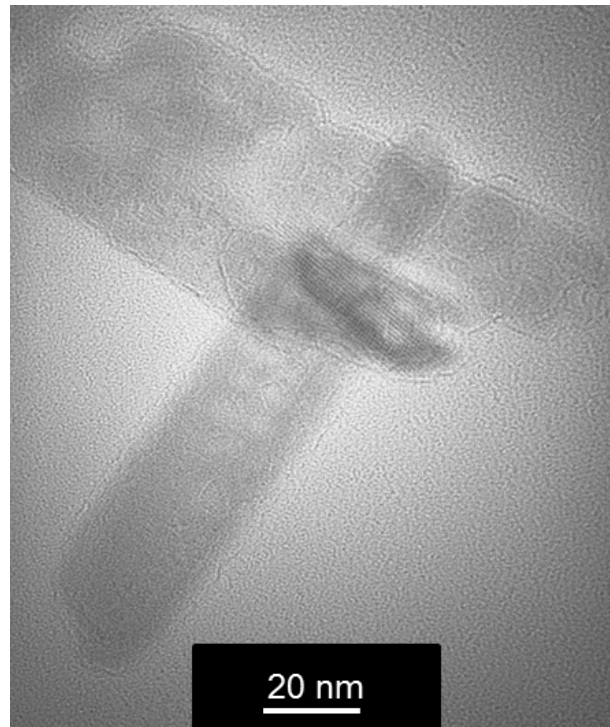


Abbildung 4.49: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von SiO_2 -funktionalisierten Ostim-Partikeln.

Silicium enthalten sind, was

$$\begin{aligned} & \frac{M_{\text{SiO}_2}}{M_{\text{Si}}} \cdot m_{\text{Si}} \\ &= \frac{60,10 \text{ g mol}^{-1}}{28,09 \text{ g mol}^{-1}} \cdot 76 \text{ mg} \\ &= 163 \text{ mg} \end{aligned} \quad (4.29)$$

SiO_2 entspricht, das bei einer 100 %-igen Ausbeute entstehen könnte. Unter der Annahme einer vollständigen Reaktion erhält man mit einer Dichte von $\rho_{\text{SiO}_2} = 2,66 \text{ g cm}^{-3}$ [136] ein Siliciumdioxid-Volumen von

$$\begin{aligned} V &= \frac{m_{\text{SiO}_2}}{\rho_{\text{SiO}_2}} \\ &= \frac{1,63 \cdot 10^{-4} \text{ kg}}{2660 \text{ kg m}^{-3}} \\ &= 6,13 \cdot 10^{-8} \text{ m}^3. \end{aligned} \quad (4.30)$$

Bei einer Dichte von $\rho_{\text{Ostim}} = 3160 \text{ kg m}^{-3}$ und einer eingesetzten Masse von $3 \cdot 10^{-5} \text{ kg}$

Ostim erhält man ein Volumen von

$$\begin{aligned} V = \frac{m}{\rho} &= \frac{3 \cdot 10^{-5} \text{ kg}}{3160 \text{ kg m}^{-3}} \\ &= 9,5 \cdot 10^{-9} \text{ m}^3. \end{aligned} \quad (4.31)$$

Das Volumen eines Ostim-Stäbchens hat bei Annahme einer durchschnittlichen Länge von 175 nm und einem Durchmesser von 20 nm die Größe $5,5 \cdot 10^{-23} \text{ m}^3$ (Gleichung 4.8) Es sind insgesamt

$$\begin{aligned} \frac{V_{\text{Ostim}}}{V_{\text{Stäbchen}}} &= \frac{9,5 \cdot 10^{-9} \text{ m}^3}{5,5 \cdot 10^{-23} \text{ m}^3} \\ &= 1,73 \cdot 10^{14} \end{aligned} \quad (4.32)$$

Ostimstäbchen enthalten. Unter der Annahme einer gleichmäßigen Bedeckung der Calciumphosphate mit SiO_2 ergibt sich die Schichtdicke D aus dem Innenradius r und dem Außenradius R . Für die Schichtdicke gilt:

$$D = R - r \quad (4.33)$$

Mit Hilfe der Volumenformel für einen Hohlzylinder erhält man

$$V = \pi R^2 h - \pi r^2 h \quad (4.34)$$

$$\begin{aligned} \Leftrightarrow R &= \sqrt{r^2 + \frac{V}{\pi h}} \\ &= \sqrt{(10 \cdot 10^{-9} \text{ m})^2 + \frac{3,5 \cdot 10^{-22} \text{ m}^3}{\pi 175 \cdot 10^{-9} \text{ m}}} \\ &= 27 \cdot 10^{-9} \text{ m} \end{aligned} \quad (4.35)$$

Die theoretisch zu erwartende Schichtdicke für die Siliciumdioxidschicht beträgt unter den oben genannten Annahmen 17 nm. Aufgrund der sehr groben Annahmen einer vollständigen Reaktion und dem Vorhandensein einheitlich großer Partikeln, die mit einer überall gleich großen Schicht SiO_2 umgeben werden, wird auf eine detaillierte Fehlerbetrachtung verzichtet. Die Quantifizierung mittels energie-dispersiver Röntgenfluoreszenz deutet darauf hin, dass das Siliciumdioxid nicht vollständig auf den Calciumphosphat-Partikeln abgeschieden wurde.

Es ist zu beachten, dass die Silica-Schicht, die über den STÖBER-Prozess auf Partikel aufgebracht wird, inhomogen sein kann.^[160]

Die Siliciumdioxid-Schicht, die durch die Kondensation von TEOS auf Nanopartikel aufgebracht wird, kann unterschiedliche Schichtdicken haben. Diese kann in manchen Systemen durch die Wahl der Reaktionsbedingungen gezielt eingestellt werden.^[161–163] In der Literatur finden sich Angaben zu sehr dünnen Schichten von 1 - 4 nm auf Gold- oder Silbernanopartikeln^[164,165] über 2 - 5 nm auf Eisenoxid-Partikeln^[166,167] bis zu relativ großen Schichtdicken von 20 - 60 nm auf Eisenoxid^[168]

Es sind jedoch im Transmissionselektronenmikroskop keine kugelförmigen Partikel in der gesamten Probe zu finden, die auf reine SiO_2 -Partikel aus dem STÖBER-Prozess hindeuten würden. Durch den STÖBER-Prozess können SiO_2 -Partikel in unterschiedlichen Größenbereichen hergestellt werden. Diese reichen von weniger als 50 nm bis über $2\text{ }\mu\text{m}$ ^[148].

Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Oberfläche der polymerstabilisierten Calciumphosphate erfolgreich mit Silica funktionalisiert wurde, diese Schicht jedoch sehr dünn ist.

Die Dispersion wurde mit APTES versetzt, um eine Amin-Funktionalisierung der SiO_2 -Schicht zu erreichen. Anschließend erfolgte eine FITC-Funktionalisierung durch Koppelung an das primäre Amin auf der Silica-Schicht. Von der Dispersion wurde ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen. Dieses ist in Abbildung 4.50 abgebildet. Es ist sehr deutlich eine Absorption bei einer Wellenlänge von 496 nm zu erkennen.

Das Fluoreszenz-Spektrum für die Anregungswellenlänge 495 nm ist in Abbildung 4.51

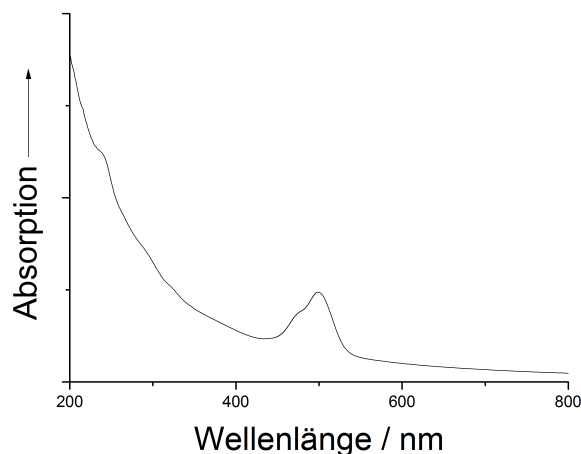


Abbildung 4.50: Absorptionsspektrum von PEI-stabilisiertem Calciumphosphat mit einer Silicahülle nach FITC-Funktionalisierung.

dargestellt. Die Partikel sind nach der Fluoreszenz-Markierung monodispers. In Abbildung 4.52 sind die Intensitäts- und Anzahl-gewichteten Größenverteilungen, die mittels

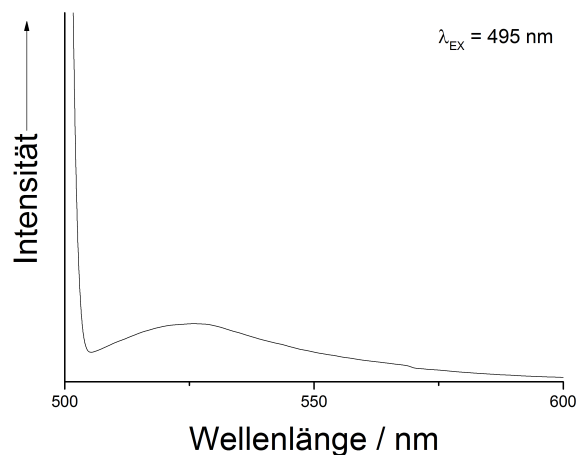


Abbildung 4.51: Fluoreszenzspektrum von PEI-stabilisiertem, Silica-funktionalisiertem Ostim nach FITC-Kopplung bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm.

dynamischer Lichtstreuung bestimmt wurden, dargestellt. Das Intensitäts-gewichtete Maximum lag bei 220 nm, das Anzahl-gewichtete Maximum bei 90 nm. Die Partikel wurden

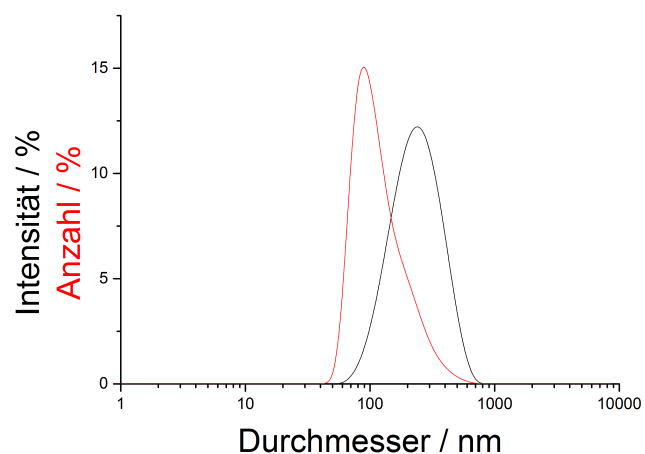


Abbildung 4.52: Intensitäts- und Anzahl-gewichtete Größenverteilung von PEI-stabilisiertem Ostim nach Funktionalisierung mit SiO_2 und Anbinden von FITC.

mit HeLa-Zellen für 24 Stunden bei 37°C in einer 5%-igen CO_2 Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mikroskopisch untersucht. In Abbildung 4.53 A ist eine repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme, in Abbildung 4.53 B die zugehörige fluoreszenzmikroskopische Aufnahme dargestellt. In Abbildung 4.53 B er-

kennt man sehr gut grün fluoreszierende Bereiche. Deren Position stimmt gut mit der Position der in Abbildung 4.53 A gezeigten HeLa-Zellen überein.

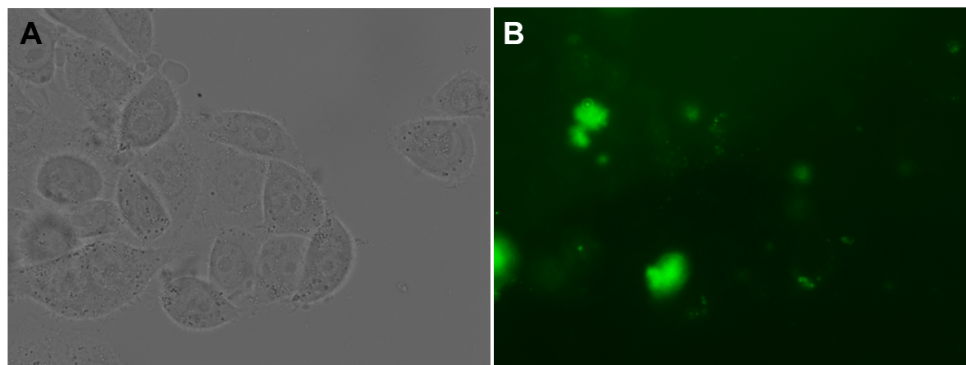


Abbildung 4.53: Licht- (links) und fluoreszenz- (rechts) mikroskopische Aufnahme von HeLa-Zellen nach Inkubation mit Siliciumdioxid-funktionalisiertem und FITC-markiertem PEI-stabilisiertem Ostim.

Bei den durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass fluoreszierende Partikel von den Zellen aufgenommen wurden. Es kann jedoch nicht sichergestellt werden, dass bei der Kopplung mit FITC keine Reaktion mit den primären Aminen des verzweigten Polyethylenims, das zur Stabilisierung der Partikel verwendet wurde, stattgefunden hat. Aus diesem Grund wurde eine analoge Funktionalisierung mit Polystyrolsulfonat-stabilisiertem Ostim durchgeführt.

Das mit dem anionischen Polyelektrolyten Polystyrolsulfonat (PSS) stabilisierte Ostim wurde mittels dynamischer Lichtstreuung charakterisiert. In Abbildung 4.54 sind die intensitäts- (oben) und Anzahl-gewichteten (unten) Größenverteilungen abgebildet. Die mit einem PDI von 0,130 monodisperse wässrige Dispersion hatte einen mittleren Intensitätsgewichteten Durchmesser von 144 nm und einen Anzahl-gewichteten Durchmesser von 95 nm. Die in Ethanol dispergierten Partikel wiesen einen hydrodynamischen Durchmesser von 178 nm nach Intensitätsgewichtung und 138 nm nach Anzahlgewichtung auf, der Polydispersitätsindex betrug 0,122. Diese Größen sind vergleichbar mit den hydrodynamischen Durchmessern der mit kationischen Polymeren stabilisierten Ostim-Partikeln und ist auf die Abmessungen der Ostimstäbchen zurückzuführen. Das ζ -Potential der wässrigen Dispersion lag bei -45 ± 13 mV. Ostim lässt sich mit PSS stabilisieren, und diese Dispersion kann in Ethanol redispersiert werden.

Nach der Kondensationsreaktion mit TEOS weisen die Partikel keinen Unterschied in der Größenverteilung auf. Diese ist in Abbildung 4.55 dargestellt. Der Polydispersitätsindex betrug 0,14. Das Maximum der Intensitätsgewichteten Größe lag bei 200 nm, das der Anzahl-gewichteten Größenverteilung bei 91 nm. Die durchschnittliche Größe betrug

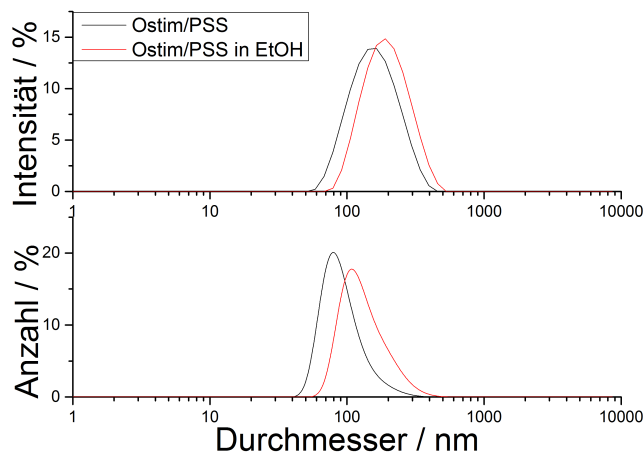


Abbildung 4.54: Mittels DLS bestimmter hydrodynamischer Durchmesser von Ostim/PSS in H_2O (schwarz) und in Ethanol (rot) nach Intensitätsgewichtung (oben) und Anzahlgewichtung (unten).

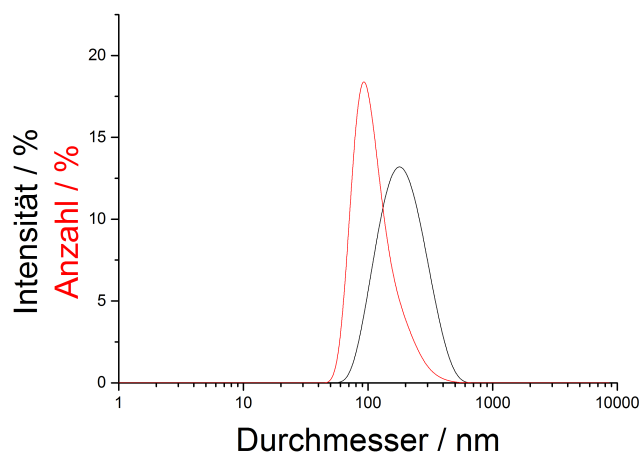


Abbildung 4.55: Anzahl- und Intensitäts-gewichtete Größenverteilung von Polystyrolsulfonat-stabilisiertem Ostim nach Aufbringen einer SiO_2 -Schicht.

170 nm. Mit -30 ± 3 mV war das ζ -Potential deutlich negativ.

Im Rasterelektronenmikroskop sind die typischen stäbchen-förmigen Ostimpartikel zu erkennen. Kugelförmige Partikel, wie sie für SiO_2 -Partikel, die nach dem STÖBER-Prozess zu erwarten wären, sind nicht zu erkennen (Abbildung 4.56).

Im energie-dispersiven Röntgenfluoreszenzspektrum (Abbildung 4.57) ist ein Emissionssignal für Silicium zu erkennen. Die Integration der Signale liefert bei Berücksichtigung der

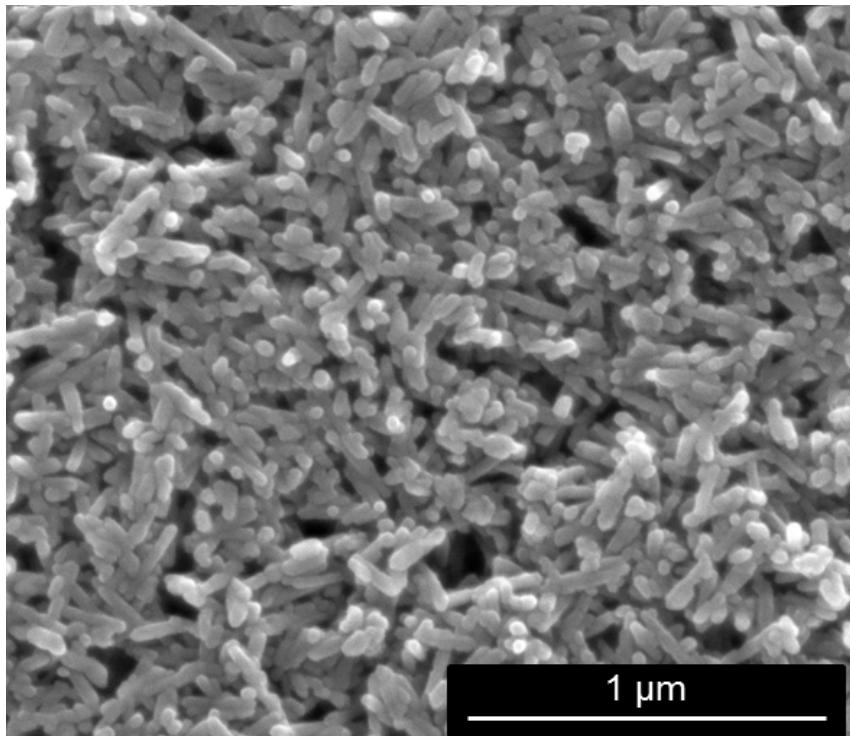


Abbildung 4.56: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von PSS-stabilisiertem Ostim nach Silicafunktionalisierung.

Elemente Phosphor, Calcium und Silicium einen Siliciumgehalt von 7,3 %. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 4.5 aufgeführt. Das molare Calcium-zu-Phosphor-Verhältnis liegt bei

Tabelle 4.5: Mittels Röntgenfluoreszenz bestimmte Zusammensetzung der mit TEOS versetzten PSS-stabilisierten Ostim-Partikel

Element	Anteil / At-%
Silicium	7,3
Phosphor	34,7
Calcium	58,0

1,67, was dem zu erwartenden Verhältnis für phasenreinen Hydroxylapatit entspricht.

Betrachtet man die von der mittels Röntgenfluoreszenz bestimmten Zusammensetzung der PEI-stabilisierten Ostim-Partikel nach Silica-Funktionalisierung (Tabelle 4.4) nur die Elemente Calcium, Phosphor und Silicium, ergibt sich ein Silicium-Gehalt von 8,1 %. Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem Silicium-Gehalt der PSS-stabilisierten Partikel nach Funktionalisierung überein. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Ausbeute an Siliciumdioxid für beide Reaktionen gleich war. Somit ist auch eine gleich große

Siliciumdioxid-Schicht auf den Partikeln zu erwarten.

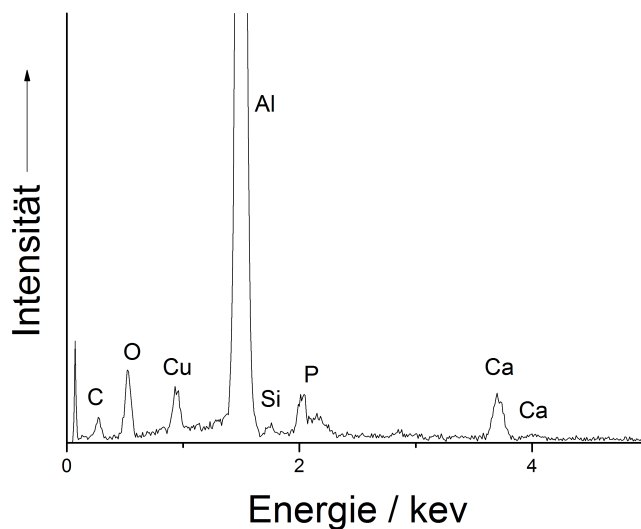


Abbildung 4.57: Röntgenfluoreszenzspektrum von PSS-stabilisierten Ostimpartikeln nach aufbringen einer SiO_2 -Schicht mit dem STÖBER-Prozess.

Das Infrarot-Spektrum zeigt bei einer Wellenzahl von 795 cm^{-1} eine für die Si–O–Si-Schwingung typische Absorptionsbande. Das Spektrum ist in Abbildung 4.58 dargestellt.

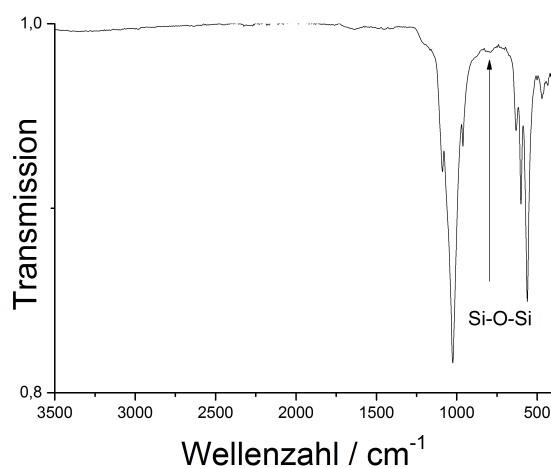


Abbildung 4.58: Infrarotspektrum von Polystyrolsulfonat-stabilisiertem Ostim nach Silica-Funktionalisierung.

Nach der Funktionalisierung mit APTES und Funktionalisierung mit FITC wurde die Dispersion nach zweimaligem Zentrifugieren und Redispergieren in Reinstwasser mittels

dynamischer Lichtstreuung und Messung des ζ -Potentials charakterisiert. Die Größenverteilungen sind in Abbildung 4.59 abgebildet. Das Intensitäts-gewichtete Maximum lag bei 190 nm, das Anzahl-gewichtete Maximum bei 90 nm. Das ζ -Potential war mit -21 ± 5 mV deutlich negativ.

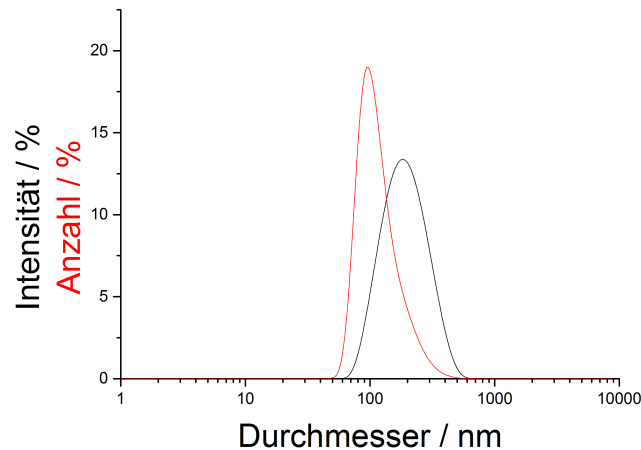


Abbildung 4.59: Mittels dynamischer Lichtstreuung ermittelte Anzahl- und Intensitäts-gewichtete Größenverteilung von Polystyrolsulfonat-stabilisiertem Ostim nach SiO_2 - und FITC-Funktionalisierung.

Die gereinigte Dispersion wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Das Emissionsspektrum für eine Anregungswellenlänge von 495 nm ist in Abbildung 4.60 dargestellt. Es ist eine deutliche Emission bei dem für FITC typischen Maximum bei einer Wellenlänge von 525 nm zu erkennen.

Zur Untersuchung der Zellaufnahme durch HeLa-Zellen wurden Zellen mit der Dispersion versetzt und für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die adhärenierten Zellen mit PBS gewaschen und mittels Licht- sowie Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Eine repräsentative Aufnahme ist in Abbildung 4.61 dargestellt. In Abbildung A ist eine lichtmikroskopische Aufnahme der Zellen, in Abbildung B die dazugehörige fluoreszenzmikroskopische Aufnahme dargestellt. Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung der fluoreszierenden Bereiche mit den Arealen, in denen Zellen lokalisiert sind. Dies ist ein Hinweis auf eine Zellaufnahme. Es lassen sich in der Fluoreszenz-Aufnahme auch die Konturen der Zellen erkennen. Ein gutes Beispiel ist der rechte untere Bildteil, in dem die Umrisse von zwei Zellen sehr deutlich zu erkennen sind. Dies ist ein Hinweis auf eine Adsorption der Partikel auf der Zelloberfläche. Der Vergleich der mit dem kationischen Polymer PEI und der mit dem anionischen Polymer PSS stabilisierten Partikel zeigt nach Silica-Funktionalisierung und Versetzen mit FITC eine typische Fluoreszenz. Außerdem ist in Zellaufnahmeversuchen für die beiden

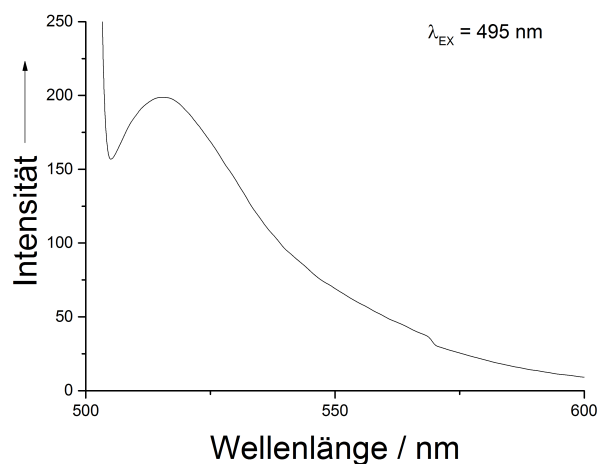


Abbildung 4.60: Fluoreszenzspektrum von PSS-stabilisiertem Ostim nach Silica-Funktionalisierung und FITC-Markierung bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm.

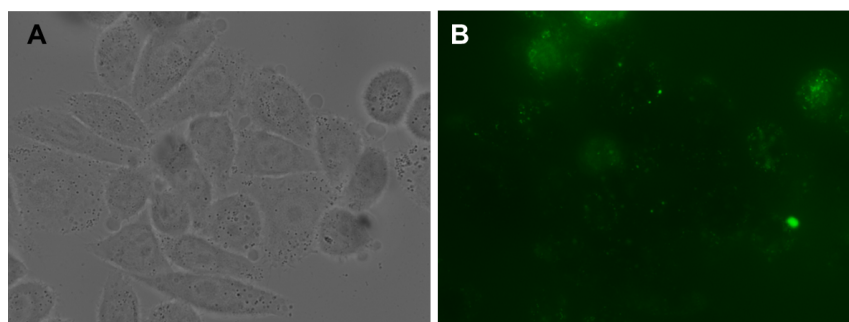


Abbildung 4.61: Licht- (links) und fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme (rechts) von HeLa-Zellen nach Inkubation mit Siliciumdioxid-funktionalisiertem und FITC-markiertem, PSS-stabilisiertem Ostim.

Systeme eine Fluoreszenz in den Zellen zu beobachten. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffes an die Silica-funktionalisierten erfolgreich verlaufen ist. Somit ist eine kovalente Funktionalisierung der mit APTES behandelten Nano-Partikel über die Amin-Gruppe des APTES möglich.

4.2.4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Calciumphosphat-Nanostäbchen erfolgreich mit einer Silicaschicht funktionalisiert werden. NEUMEIER^[169] verwendete ebenfalls stäbchenförmiges Calciumphosphat, das mit einer Länge von 100 nm und einem Durchmesser von 30 nm vergleichbare Dimensionen zu Ostim hat.

Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen waren vergleichbar mit denen von NEUMEIER.

Durch eine Silanisierung konnten Amine als funktionelle Gruppe eingeführt werden. Hieran konnte FITC als Modellmolekül kovalent gebunden werden. In Arbeiten von KOZLOVA *et al.*^[158] wurden kugelförmige Calciumphosphatpartikel mit SiO₂ funktionalisiert. Es wurde ebenfalls FITC als Modellmolekül angebunden. Außerdem wurden von KOZLOVA Thiole an die Oberfläche aufgebracht, um anschließend eine kovalente Anbindung von Antikörpern vorzunehmen.^[158] Die verwendeten Calciumphosphatpartikel wurden in der Synthese vor der Silicafunktionalisierung mit Polyethylenimin stabilisiert.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde nur APTES zur Funktionalisierung der Siliciumdioxid-Schicht verwendet.

Ein Vorteil bei den hier gezeigten Partikeln liegt in der großen Variabilität an möglichen Polymeren. Während es bei Calciumphosphaten, die während der Fällung mit einem Polymer beschichtet werden, schwierig ist, die Fällungsparameter auf Reaktionen mit einem anderen Polymer zu übertragen, sind die hier verwendeten Calciumphosphat-Stäbchen sehr gut nachträglich mit einem Polymer zu stabilisieren. Die Stabilisierung von Ostim mit kationischen Polymeren wurde im Rahmen dieser Arbeit systematisch untersucht (4.1). Hierbei zeigte sich ebenfalls, dass die Systeme nach Zentrifugation sehr gut in Ethanol redispergierbar sind.

Im Rahmen weiterer Arbeiten sollten Ostimpartikel, die mit unterschiedlichen Polyelektrolyten stabilisiert werden, mit Silica funktionalisiert werden. Anschließend kann eine Antikörper-Anbindung ausgehend von KOZLOVA *et al.* erfolgen. Mit diesen Partikeln können zell-biologische Untersuchungen durchgeführt werden. Hierdurch können Einflüsse durch das verwendete Polymer auf ein *Targeting* untersucht werden. Weiterhin kann ein Einfluss der Morphologie durch den Vergleich von kugelförmigen Partikeln mit stäbchenförmigen Partikeln untersucht werden.

4.3 Darstellung Safranin-markierter Partikel

4.3.1 Einleitung

Bei Safraninen handelt es sich um Farbstoffe. Safrain T wird in der Zellbiologie zur Färbung verwendet.^[170] Daneben ist Safranin ein Photosensibilisator.^[171,172] Die Strukturformel ist in Abbildung 4.62 abgebildet. Das primäre Amin am Safranin macht eine Kopplung an die

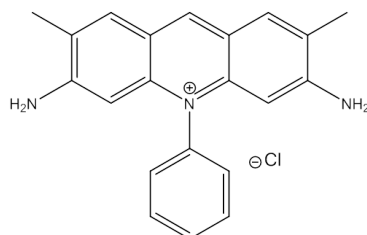


Abbildung 4.62: Strukturformel von Safranin.

Carbonsäure der Carboxymethylcellulose (CMC) möglich. Dies erfolgt über eine Aktivierung der Carboxylgruppe mit Carbodiimid. Eine solche Kopplung ist für Aminofluorescein an Carboxymethylcellulose bekannt.^[173]

Die Reaktion verläuft in mehreren Schritten. Durch Carbodiimide können Carboxylgruppen zu *O*-Acylisoharnstoffen reagieren. Im nächsten Schritt können primäre Amine mit den *O*-Acylisoharnstoffen zu Carbonsäureamiden reagieren. Da *O*-Acylisoharnstoffe in wässriger Lösung zu *N*-Acylisoharnstoffen reagieren können, können die *O*-Acylisoharnstoffe mit 1-Hydroxybenzotriazol zu Aktivestern reagieren, die eine höhere Hydrolysestabilität aufweisen. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 4.63 aufgeführt.

4.3.2 Synthese

Ostim wurde mit dem anionischen Polymer Carboxymethylcellulose (CMC) stabilisiert. Hierzu wurde 1 mL einer 6 %-igen Ostim-Dispersion mit 2 mL einer Carboxymethylcelluloselösung mit einer Massenkonzentration von 2 g L^{-1} mit 7 mL Reinstwasser zusammengegeben und eine Minute mittels Ultraschalldisperser (Sonotrode 7, Amplitude 70 %) behandelt. Es folgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 4700 g und ein Redispergieren in 10 mL Ethanol. Ein zweiter Ansatz wurde analog angesetzt, jedoch in Reinstwasser redispergiert. Die Charakterisierung erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung und Messung des ζ -Potentials.

Zur Darstellung von Safranin-funktionalisierter Carboxymethylcellulose (Abbildung 4.62) wurden ausgehend von PEETSCH^[173] 0,5 g Carboxymethylcellulose in 50 mL *N*-Morpholinoethansulfonsäure-Puffer (MES) gelöst. 250 mg Safranin wurden in 30 mL Ethanol gelöst

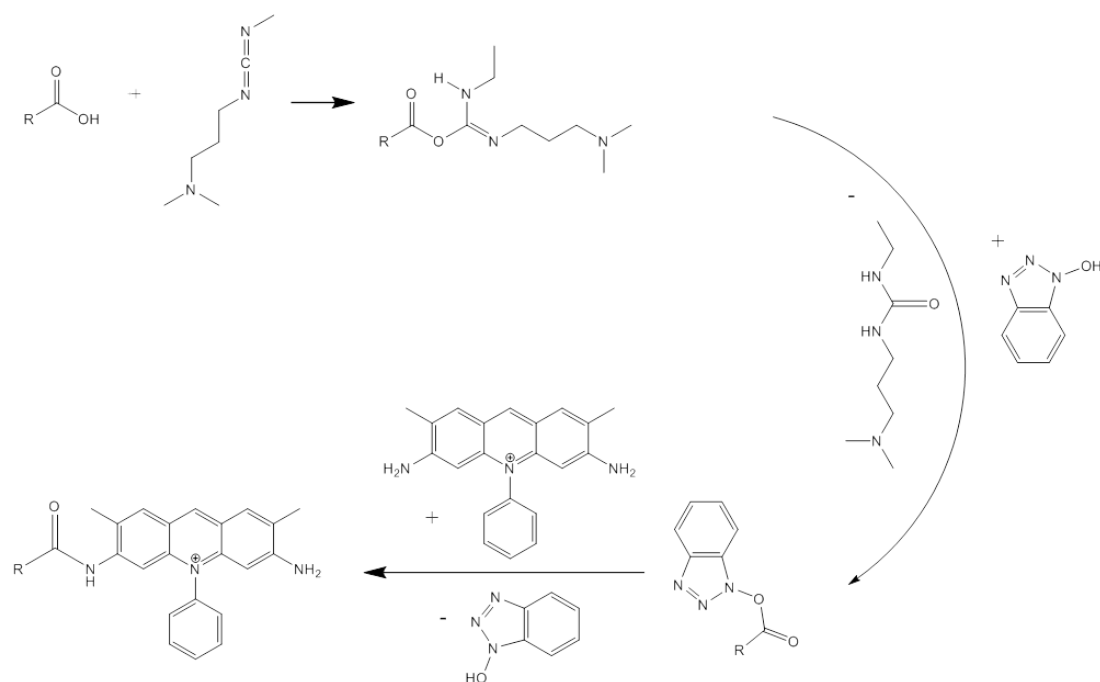


Abbildung 4.63: Mechanismus zur Carbonsäureamidbildung.

und zu der CMC-Lösung gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,1 g Hydroxybenzotriazol-Hydrat, die zuvor in 3 mL Ethanol gelöst wurden. Es folgte die Zugabe von 0,15 g 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid, die in 3 mL Ethanol gelöst wurden. Die Reaktionslösung wurde für 15 Stunden unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt.

Nach der Reaktion wurde die Reaktionslösung mit Ethanol versetzt, um das Polymer auszufällen. Nach einer Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Polymer getrocknet. Die Darstellung von Ostim mit Safranin-funktionalisierter Carboxymethylcellulose wurde analog zu der Darstellung von Carboxymethylcellulose stabilisiertem Ostim durchgeführt.

Als Kontrolle wurden die gleichen Mengen Carboxymethylcellulose und Safranin ohne Kopplungsreagenzien für 15 Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. Die Kontrollprobe wurde ebenfalls mit Ethanol ausgefällt. Anschließend wurden beide Proben mittels Infrarotspektroskopie untersucht. Die Partikel wurden mit zu humanen mesenchymalen Stammzellen gegeben. Die anfängliche Zellkonzentration lag bei 5000 Zellen / mL, die Calciumphosphatkonzentration bei $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nach einer 24 stündigen Inkubation erfolgte eine Färbung der Zellen mit Calcein-AM. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Anschließend wurden mittels Laser-Scanning-Mikroskopie Aufnahmen angefertigt. Diese Arbeiten wurden am Berufsgenossenschaftlichen Universitätsklinikum Bergmanns-

heil von Frau Peter aus der Arbeitsgruppe von Prof. Köller am Klinikum Bergmannsheil durchgeführt.

4.3.3 Charakterisierung

Die Carboxymethylcellulose wurde bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend erfolgte eine Charakterisierung mittels Infrarotspektroskopie. Die Spektren der mit Safranin gekoppelten Carboxymethylcellulose und der Kontrollprobe ohne Kopplungsreagenz sind in Abbildung 4.64 dargestellt. Bei beiden Spektren ist eine gute Übereinstimmung der Banden-

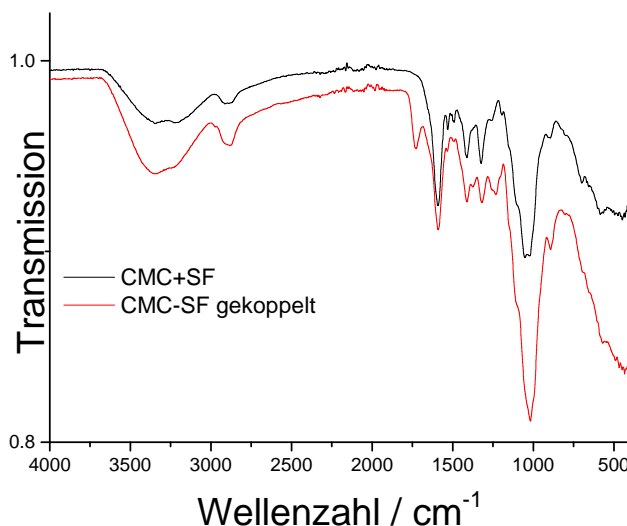


Abbildung 4.64: Infrarotspektren von Safranin-gekoppelter Carboxymethylcellulose (rot) und der Kontrollprobe.

lagen und Bandenintensitäten zu erkennen. Die Probe, bei der die Carbodiimid-Kopplung durchgeführt wurde, zeigt allerdings eine deutliche Absorptionsbande bei $\tilde{\nu} = 1730 \text{ cm}^{-1}$, die für das entstandene Amid charakteristisch ist. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Kopplung erfolgreich durchgeführt wurde.

Die mit CMC-stabilisierten Ostimpartikel wurden mittels dynamischer Lichtstreuung und Messung des ζ -Potentials charakterisiert. Die durchschnittliche Größe der in Wasser dispergierten Partikel lag bei 145 nm, das Maximum der Intensitäts-gewichteten Größenverteilung lag bei 170 nm, das Maximum der Anzahl-gewichteten Größenverteilung bei 105 nm. Mit einem PDI von 0,16 kann die Dispersion als monodispers angesehen werden. Die Größenverteilungen sind in Abbildung 4.65 dargestellt. Das ζ -Potential betrug $-38 \pm 7 \text{ mV}$, so dass von einer elektrostatischen Stabilisierung der Partikel ausgegangen werden kann.

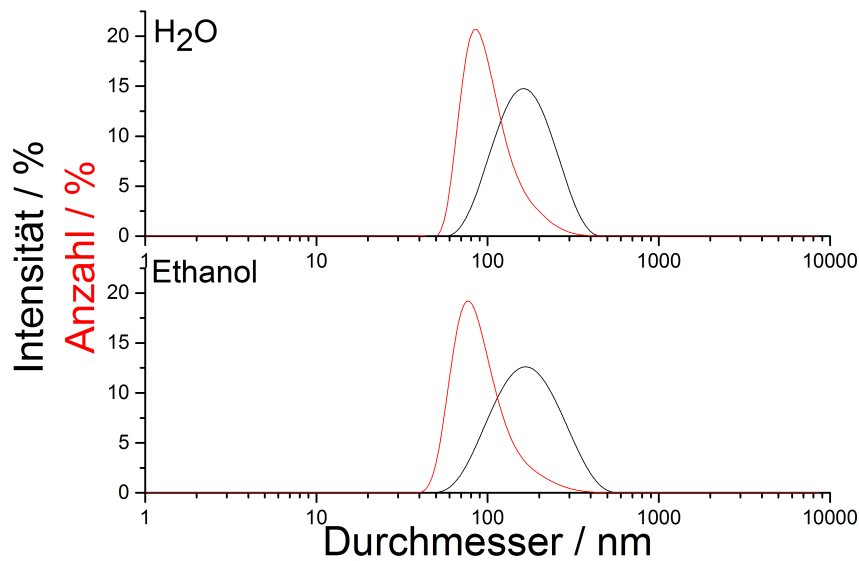


Abbildung 4.65: Intensitäts- (schwarz) und Anzahl (rot)-gewichtete Größenverteilung von CMC-stabilisierten Ostimpartikeln.

Die durchschnittliche Größen der erneut zentrifugierten und in Ethanol redispergierten Partikel lag bei 155 nm, das Maximum der Intensitäts-gewichteten Größenverteilung lag bei 185 nm, das der Anzahl-gewichteten Größenverteilung bei 96 nm. Mit einem PDI von 0,14 können die in Ethanol redispergierten Partikel ebenfalls als monodispers angesehen werden. Das ζ -Potential lag bei -13 ± 21 mV. Aufgrund der unterschiedlichen Dispersionsmittel sind die Werte nicht direkt vergleichbar.

Weiterhin wurde Ostim mit der Safranin-funktionalisierten CMC stabilisiert. Die mittels dynamischer Lichtstreuung ermittelte Größenverteilung ist in Abbildung 4.66 dargestellt. Es wurde eine monodisperse Größenverteilung mit einem PDI von 0,17 und einer durchschnittlichen Teilchengröße von 160 nm erhalten. Das Maximum der Intensitäts-gewichteten Größenverteilung lag bei 160 nm, das Maximum der Anzahl-gewichteten Größenverteilung lag bei 145 nm. Das ζ -Potential betrug -39 ± 6 mV. Die hydrodynamischen Radien und ζ -Potentiale der mit CMC stabilisierten Ostim-Partikel sind vergleichbar mit den Ostim-Partikeln, die mit Safranin-funktionalisierter CMC stabilisiert wurden.

Das Fluoreszenzspektrum der Dispersion bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 520$ nm ist in Abbildung 4.67 dargestellt. Man erkennt deutlich ein Emissionsmaximum bei 576 nm. In Abbildung 4.68 ist eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von humanen mesenchymalen Stammzellen nach Inkubation mit Ostim-Partikeln, die mit Safranin-funktionalisierter CMC stabilisiert wurden, dargestellt. Die Zellen wurden mit Calcein grün angefärbt. Die

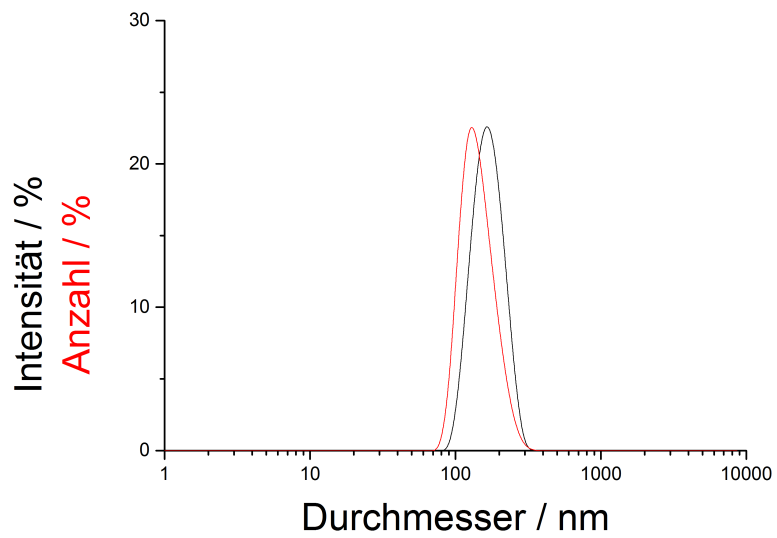


Abbildung 4.66: Mittels DLS bestimmte Größenverteilung von Ostim, das mit Safranin-funktionalisierter CMC stabilisiert wurde.

Zellkerne wurden mit DAPI blau gefärbt. Man erkennt die rote Fluoreszenz der Safranin-markierten Partikel in den grün markierten Zellen sehr gut.

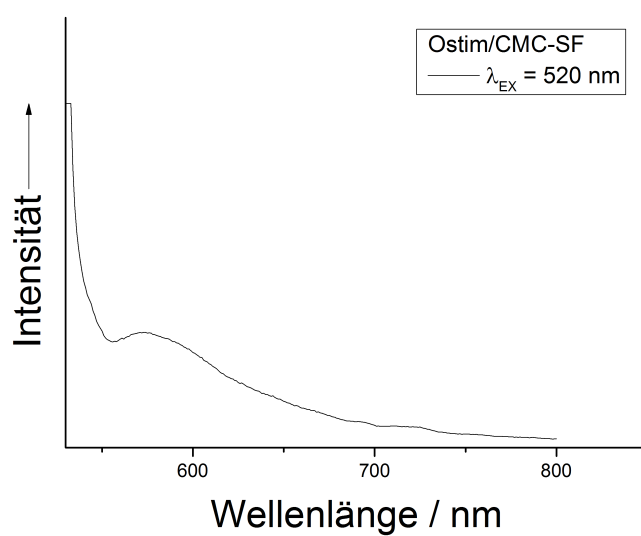


Abbildung 4.67: Fluoreszenzspektrum von Ostim, das mit Safranin-funktionalisierter Carboxymethylcellulose stabilisiert wurde.

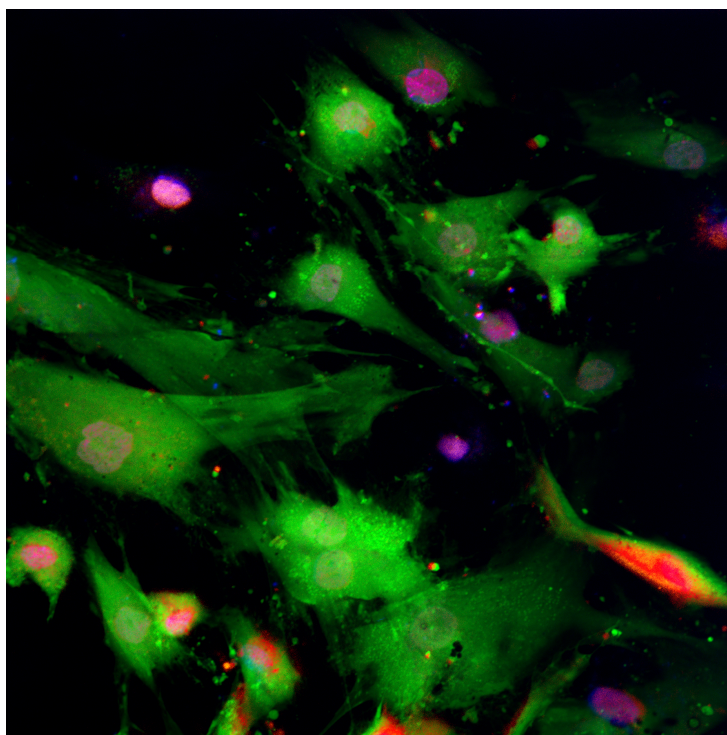


Abbildung 4.68: Laser-Scanning-Mikroskopie von Calcein (grün) und DAPI (blau) gefärbten Stammzellen nach Inkubation mit Ostim-Partikeln, die mit Safranin-funktionalisierter Carboxymethylcellulose (rot) stabilisiert wurden.

4.3.4 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass Ostim-Nanostäbchen mit dem anionischen Polyelektrolyten Carboxymethylcellulose stabilisiert werden können. Die Partikel weisen mit einem Intensitäts-gewichteten Durchmesser von 160 nm eine ähnliche Größe wie die mit kationischen Polymeren stabilisierten Ostim-Nanostäbchen auf (Kapitel 4.1.14). Die Größenverteilung ist monodispers. Die Partikel lassen sich nach Zentrifugation in Ethanol redispersieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Carboxymethylcellulose mit dem Farbstoff Safranin markiert werden konnte.

Die Partikel zeigen trotz ihrer negativen Ladung eine gute Zellaufnahme. Dieser Befund deckt sich mit Ergebnissen von PEETSCH, der die Zellaufnahme von kugelförmigen Calciumphosphatpartikeln, die mit Fluorescein-markierter CMC stabilisiert waren, zeigte.^[173]

5 Calciumphosphate und Polyplexe zur Transfektion

5.1 3-schalige Ostim-PEI-DNA-PEI Partikel und Polyplexe

5.1.1 Einleitung

In der Literatur werden Calciumphosphat-Nanopartikel zur Transfektion diskutiert. Hierbei wurden die Partikel zur Vermeidung einer Agglomeration mit dem kationischen Polymer Polyethylenimin stabilisiert. Auf dieses konnte DNA aufgebracht werden. Anschließend wurden die Partikel mit einer weiteren Schicht Polyethylenimin stabilisiert, um eine bessere Aufnahme in die Zellen zu erreichen.^[131,132] Auffallend war die sehr geringe Transfektionseffizienz bei HeLa-Zellen von PEI-stabilisierten Partikeln, die mit EGFP-kodierender DNA dotiert wurden, so dass sie ein positives ζ -Potential aufwiesen. Die Transfektionseffizienz lag bei etwa 5 % und ist mit der in Kapitel 4.1.13 vergleichbar.

Die 3-schaligen Ostim-Partikel mit zwei Schichten Polyethylenimin und einer Schicht EGFP-kodierender DNA zeigten eine deutlich höhere Transfektionseffizienz. KLESING erreichte mit diesen Partikeln bei HeLa-Zellen eine Transfektionseffizienz von 50 %. Dies wurde zum Einen auf den kationischen Charakter der Partikel zurückgeführt, die besser mit der negativ geladenen Zellmembran interagieren können. Zum Anderen wurde von einem besseren Schutz der Nukleinsäure vor enzymatischem Abbau ausgegangen. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden die 3-schaligen Partikel nach KLESING hergestellt. Um die notwendige DNA- und Polyethylenimin-Menge zu finden, die für eine vollständige Umladung notwendig ist, wurden ebenfalls Umladungsexperimente durchgeführt, bei denen das ζ -Potential in Abhängigkeit der zugegebenen Polyelektrolytmenge zu der Dispersion gemessen wurde. Als Modell wurde EGFP-kodierende DNA eingesetzt. Die Transfektionseffizienz konnte über den Anteil an fluoreszierenden Zellen bestimmt werden. KLESING verwendete für die Umladungsexperimente eine DNA mit einer Kettenlänge kleiner 50 Basenpaare. In diesen Versuchen wurde eine DNA-Menge von 150 - 200 μg pro 1 mL einer Ostimdispersion mit $c = 0,3 \text{ g L}^{-1}$ ermittelt, die für eine Umladung der mit verzweigtem PEI stabilisierten Ostim-Partikel notwendig ist. In Transfektionsexperimenten, bei denen PEI-stabilisiertes Ostim mit DNA umgeladen und anschließend mit einer weiteren Schicht PEI funktionalisiert wurde, erfolgten keine Reinigungsschritte nach Zugabe der Polymere, um eine Beschädigung der DNA zu vermeiden.

In Kapitel 4.1.8 wurde gezeigt, dass die für eine Umladung notwendige DNA-Menge bei 100 mg DNA pro 1 g Ostim liegt, wenn die Kettenlänge der DNA 2000 Basenpaare aufweist. Bei einer weiteren Zugabe von DNA kommt es zu keiner weiteren Änderung im ζ -Potential. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die DNA nicht auf der Partikeloberfläche adsorbiert, sondern als freie DNA in Lösung vorliegt. Eine weitere Zugabe von Polyethylenimin kann zur Ausbildung von Polyplexen führen.

Polyplexe entstehen durch die Agglomeration von Polyelektrolyten mit entgegengesetzter Ladung durch die elektrostatischen Anziehungskräfte. Die Größe von Polyplexen hängt von vielen Faktoren, wie zum Beispiel der Art des kationischen Polymers, seiner molaren Masse und dem Verhältnis von DNA zum Polymer, ab.^[174,175]

Polyplexe als nicht-virale Transfektionsmittel sind aus der Literatur für verschiedene kationische Polyelektrolyte bekannt.^[176–179] So sind etwa 200 nm große, kugelförmige Polyplexe aus Polylysin und DNA bekannt.^[180] Es finden sich Arbeiten zu Polyplexen aus verzweigtem Polyethylenimin.^[181–184] Daher ist es wichtig, zu untersuchen, ob die vergleichsweise hohen Transfektionsraten von KLESING auf 3-schalige Partikel oder eventuell auf in der Dispersion vorhandene Polyplexe zurückzuführen sind.

5.1.2 Durchführung

Es wurde Ostim mit verzweigtem Polyethylenimin ($M_W = 25$ kDa) stabilisiert. Hierzu wurde 1 mL einer 0,3 %-igen Dispersion mit 1 mL der wässrigen Polymerlösung ($c = 2$ g L⁻¹) und 8 mL Reinstwasser gemischt. Anschließend wurde die Dispersion mittels Ultraschalldispenser für 1 min behandelt (Amplitude 70 %). Zur Abtrennung des nicht-adsorbierten Polymers erfolgte eine 30-minütige Zentriugation bei 4700 g. Im Anschluss wurde der Überstand entfernt, und es erfolgte ein Redispersieren in 10 mL Reinstwasser mittels Ultraschalldispenser (2 min, 70 % Amplitude).

Zur Darstellung von Polyethylenimin-DNA-Polyplexen wurden wässrige PEI-Lösungen mit Reinstwasser verdünnt und mit DNA-Lösungen zusammengegeben. Nach einer intensiven Durchmischung mittels Vortexer erfolgte eine Charakterisierung mittels dynamischer Lichtstreuung und Messung des ζ -Potentials. Die verwendeten Volumina sind in der Tabelle 5.1 aufgeführt. Die Konzentration der DNA-Lösung betrug 1 g L⁻¹, die Polyethyleniminlösung hatte eine Konzentration von 2 g L⁻¹. Die Probe wurde mit EGFP-kodierender DNA angesetzt. Die Polyplexe wurden mittels Rasterkraftmikroskopie charakterisiert. Die Rasterkraftmikroskopie ist eine seit langem verwendete Methode zur Größenbestimmung von Polyplexen.^[180,185,186] Zur Charakterisierung wurden 100 μ L dieser Dispersion mit 900 μ L Reinstwasser verdünnt. 20 μ L dieser Dispersion wurden auf einen Objektträger ge-

tropft und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Messung mittels Rasterkraftmikroskopie erfolgte im *tapping-mode*. Zum Vergleich wurden je auch eine eingetrocknete DNA- und PEI-Lösung untersucht.

Für die zellbiologischen Untersuchungen wurden 40 μL der Polyplexdispersion mit 500 μL Zellmedium gemischt. 500 μL dieser Dispersion wurden zu 25000 HeLa-Zellen gegeben. Nach 7 Stunden wurde das Zellmedium gewechselt. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37 °C in einer 5 %-igen CO_2 Atmosphäre wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die lichtmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Proben. Die Zellvitalität wurde mittels MTT-Test bestimmt.

Es wurde untersucht in wie weit die mit Polyethylenimin stabilisierten und mit EGFP-kodierender DNA sowie einer weiteren Schicht Polyethylenimin umgeladenen Partikel die hohen Transfektionsraten in den Arbeiten von KLESING bewirkten oder ob die Transfektionsraten auf evtl. vorhandenen Polyplexe aus Polyethylenimin und DNA zurückzuführen sind. Hierzu wurde Polyethylenimin stabilisiertes Ostim nach KLESING mit EGFP-kodierender DNA funktionalisiert und anschließend mit einer äußeren Schicht Polyethylenimin umgeladen. Anschließend wurde die Dispersion bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Niederschlag im gleichen Volumen Reinstwasser unter Eiskühlung redispergiert. Mit dem Überstand und den redispergierten Partikeln wurden Transfektionsexperimente durchgeführt. Diese erfolgten analog zu der Transfektion der Polyplexdispersion.

5.1.3 Ergebnisse und Diskussion

In Tabelle 5.1 sind die mittels dynamischer Lichtstreuung ermittelten durchschnittlichen Durchmesser, Polydispersitätsindices und ζ -Potentiale der Polyplexe aufgelistet. Es zeigt sich, dass ein deutlicher Überschuss an PEI notwendig ist, um Polyplexe mit einem positiven ζ -Potential zu erhalten. Bei einem Massenverhältnis von PEI zu DNA von 4:1 erhält man monodisperse Systeme. Bei einer sehr starken Verdünnung der Polyelektrolyte (Probe 9) ist das ζ -Potential mit $40 \pm 8 \text{ mV}$ deutlich positiv. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Polyelektrolytkonzentration und dem ζ -Potential der Polyplexe wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht genauer untersucht. Aus der Literatur ist ein Verhältnis von positiven Ladungen des PEIs zu negativen Ladungen der DNA von 7,5:1 bekannt, um transfizierende Polyplexe zu erhalten.^[187] Die Polyplexe in Probe 9 weisen mit einem durchschnittlichen hydrodynamischen Durchmesser von 100 nm eine vergleichbare Größe wie polymerstabilisierte Ostim-Partikel (Kapitel 4.1) auf. Die Größe der Polyplexe ist mit

Tabelle 5.1: Hydrodynamische Durchmesser und ζ -Potentiale von Polyplexen unterschiedlicher Zusammensetzung

Probe	V_{H_2O} / μ L	V_{PEI} / μ L	V_{DNA} / μ L	Durchmesser / nm	PDI	ζ -Potential / mV	Standardabweichung / mV
1	700	100	100	3200	1,0	8,4	3,4
2	700	100	200	490	0,28	-6,4	3,2
3	700	200	100	190	0,11	10,4	3,5
4	700	300	100	106	0,20	8,1	5,8
5	700	250	100	122	0,15	9,4	3,9
6	600	300	100	196	0,20	9,8	3,2
7	600	250	100	204	0,12	9,4	3,5
8	600	200	100	433	0,29	9,9	4,5
9	600	20	10	99	0,14	40,1	7,9

der aus der Literatur bekannten Größe vergleichbar. Diese wird mit 90 nm - 130 nm angegeben.^[187]

Die Polyplexe aus Probe 9 wurden mittels Rasterkraftmikroskopie charakterisiert. In Abbildung 5.1 sind sehr gut kugelförmige Polyplexe zu erkennen. Die kugelförmige Morphologie ist die für Polyplexe am häufigsten zu erwartende Form.^[185] Der Durchmesser liegt

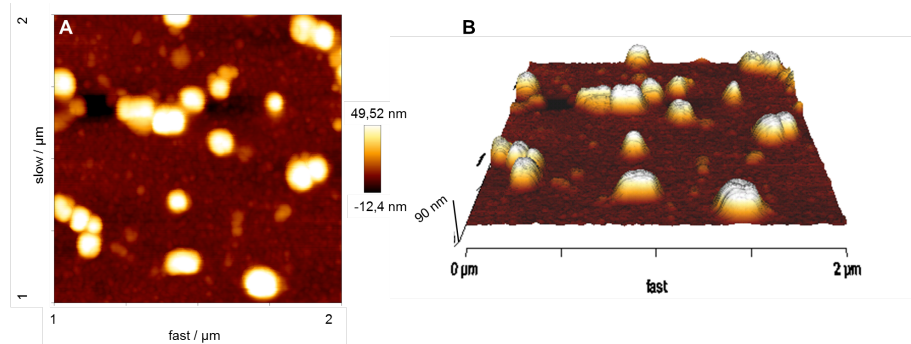


Abbildung 5.1: Rasterkraftmikroskopische Aufnahme von PEI-DNA-Polyplexen (A) und 3-D-Darstellung der Probe (B).

bei etwa 200 nm. Er ist damit kleiner als der mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmte hydrodynamische Radius. Dies kann auf die Struktur der Polyplexe zurückgeführt werden. Da diese aus keinem massiven Kern bestehen, können sie beim Eintrocknen kollabieren. Hierdurch werden sie flacher, aber auch breiter als in Dispersion. Die Größe und die Morphologie stimmen sehr gut mit den aus der Literatur bekannten Daten überein. PETERSEN *et al.* beschrieben Polyplexe aus DNA und verzweigtem Polyethylenimin ($M_W = 25$ kDa) mit einer Größe von 140 ± 60 nm.^[188]

Um sicherzustellen, dass es sich bei den aufgenommenen Strukturen um keine Trocknungsartefakte von Polyethylenimin oder DNA handelt, wurden auch diese Polymere einzeln mittels Rasterkraftmikroskopie untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.2 gezeigt. Es zeigt sich, dass das Polyethylenimin partikuläre Trocknungsartefakte bildet. Die Halbwertsbreite ist jedoch mit 500 nm - 750 nm deutlich größer als die Halbwertsbreite der Polyplexe. Die Polyplexe wurden, wie in Abschnitt 5.1.2 beschrieben, mit eEGFP-kodierender

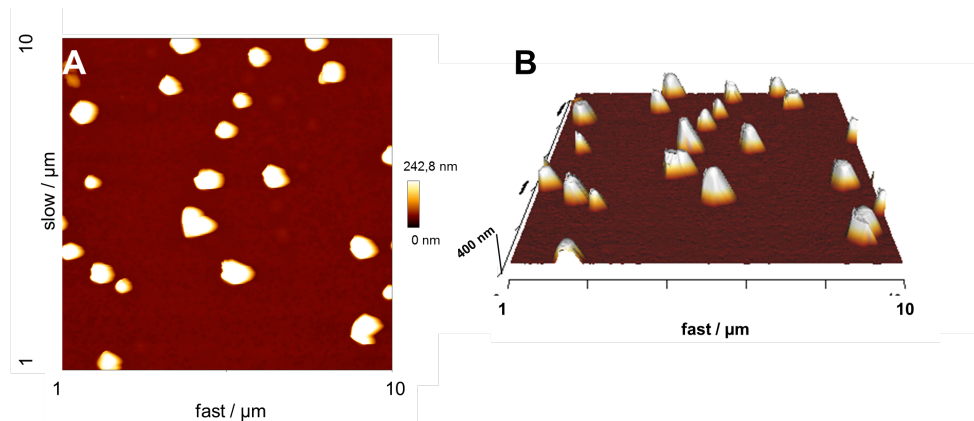


Abbildung 5.2: Rasterkraftmikroskopie von getrockneter Polyethyleniminlösung (A) und 3-D-Darstellung der Probe (B).

DNA hergestellt, um Transfektionsexperimente durchzuführen. Exemplarische Aufnahmen sind in Abbildung 5.3 gezeigt. Es ist ein sehr hoher Anteil an fluoreszierenden Zellen zu erkennen. Nach Auszählen von 3 Bildern wurde eine Transfektionseffizienz von $33 \pm 6 \%$ ermittelt. Die mittels MTT-Test bestimmte Zellvitalität lag bei $83 \pm 8 \%$. In Abbildung 5.4

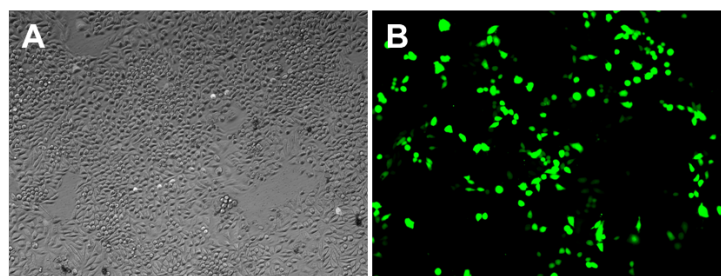


Abbildung 5.3: Licht- (A) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (B) von HeLa-Zellen nach Transfektion mit Polyethylenimin-DNA-Polyplexen.

sind die mikroskopischen Aufnahmen nach Transfektion mit den redispergierten 3-schaligen Partikeln (unten) und dem Überstand der Zentrifugation (oben) gezeigt. Man erkennt eine deutlich höhere Transfektionseffizienz für die redispergierten Partikel als für die im Überstand enthaltenen Polyplexe. Die Transfektionseffizienz lag für die redispergierten Partikel

bei $15 \pm 5 \%$, für die Polyplexe im Überstand bei $4 \pm 2 \%$. Aus den Transfektionsergebnissen

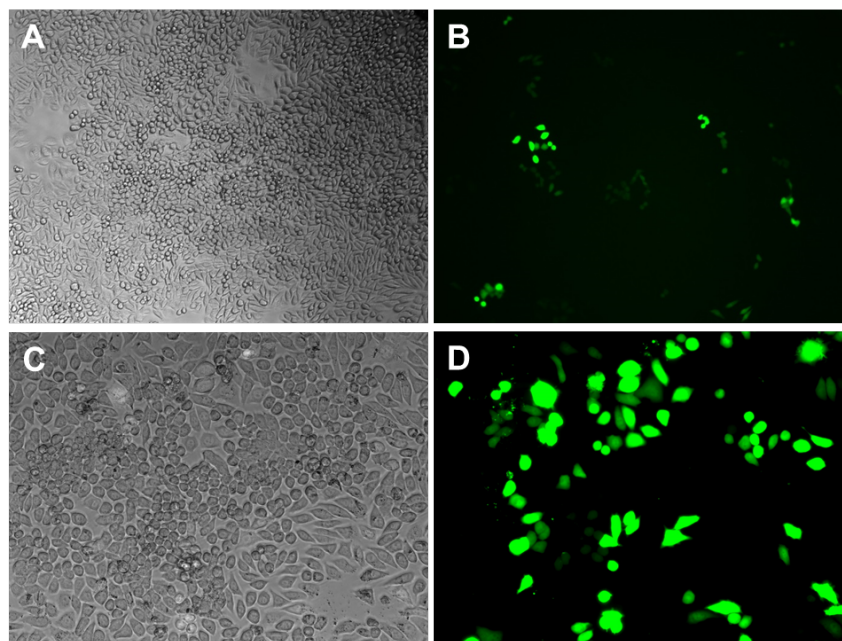


Abbildung 5.4: Mikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen nach Transfektion mit redispergierten Ostim-PEI-DNA-PEI Partikeln (C, D) und dem Überstand der Zentrifugation (A, B).

kann abgeleitet werden, dass in der Dispersion Polyplexe vorliegen, die durch Zentrifugation nicht abgetrennt wurden. Weiterhin lässt sich feststellen, dass die redispergierten Partikel den Hauptteil der Transfektionseffizienz ausmachen. Es kann jedoch nicht gesagt werden, ob aus der Dispersion auch Polyplexe abgetrennt wurden. Auch kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob es zur Bildung von Polyplexen gekommen ist. Auffallend ist, dass die DNA nach der Behandlung des Zentrifugates mit dem Ultraschalldispenser noch ihre Funktion aufweist, da DNA durch die Behandlung mit Ultraschall fragmentiert werden kann.^[189]

5.1.4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Polyplexe aus verzweigtem Polyethylenimin und EGFP-kodierender DNA dargestellt und kolloidchemisch charakterisiert. Die Polyplexe zeigten eine sehr hohe Transfektionseffizienz.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei den literaturbekannten Ostimpartikeln, die mit Polyethylenimin stabilisiert, mit EGFP-kodierender DNA funktionalisiert und anschließend mit Polyethylenimin umgeladen werden, neben den Partikeln auch Polyplexe, beste-

hend aus nichtadsorbierten Polymeren, in der Dispersion vorliegen. Eine solche Dispersion wurde zentrifugiert und anschließend wurde die ursprüngliche Dispersion, die redispergierte Dispersion und der Überstand nach Zentrifugation zu Zellen gegeben. Alle drei Proben zeigten eine erfolgreiche Transfektion an HeLa-Zellen. Hierdurch zeigt sich, dass eine Abtrennung von überschüssigem, nicht-adsorbierten Polymer wichtig ist, wenn die Partikel weiter funktionalisiert werden, um den möglichen Einfluss einer solchen Funktionalisierung in biologischen Systemen zu untersuchen.

Die Transfektionsergebnisse in diesem Kapitel deuten jedoch darauf hin, dass die 3-schaligen Partikel nach KLESING einen wesentlichen Einfluss auf die hohen Transfektionsergebnisse hatten.

5.2 Polymerkapseln

5.2.1 Einleitung

Calciumphosphat-Nanopartikel wurden in der Literatur als Transfektionsmittel eingesetzt. Es wurden Calciumphosphat-Partikel mit Polyethylenimin stabilisiert. Anschließend wurde DNA durch die *Layer-by-Layer* Technik aufgebracht und es wurde eine weitere Schicht Polyethylenimin aufgebracht, um ein kationisches System zu erhalten.^[43,131]

Diese Partikel zeigen eine gute Transfektionseffizienz. Ebenfalls sind Polyplexe zur Transfektion sehr weit verbreitet.

Ziel der Arbeit ist die Darstellung von Calciumphosphatpartikeln und das Aufbringen von zwei weiteren Polymerschichten. Durch das Herauslösen des Calciumphosphat-Kerns lassen sich Hohlkapseln darstellen. Diese können als Polyplexe mit einer definierten Struktur angesehen werden. Diese Systeme werden synthetisiert und charakterisiert. Anschließend folgen zell-biologische Untersuchungen und der Vergleich zu Partikeln, bei denen der Kern nicht herausgelöst wurde, und Polyplexen, die durch Zugabe des kationischen Polymers und DNA hergestellt wurden.

Als Polymer wurde Polyallylaminhydrochlorid verwendet. Dieses Polymer ist in der *Layer-by-Layer* Technik sehr weit verbreitet.^[190,191] Die molare Masse betrug 56000 Da. Die *Layer-by-Layer* Technik geht auf Arbeiten von ILER^[192] zurück und wurde von DECHER^[193] maßgeblich weiterentwickelt. Diese Arbeiten wurden an makroskopischen Oberflächen durchgeführt, die durch alternierendes Eintauchen in eine kationische bzw. anionische Polyelektrolytlösung zum Aufbringen einer Polymerschicht und Eintauchen in eine Waschlösung zum Entfernen des überschüssigen Polymers beschichtet wurden.

Es gibt zahlreiche unterschiedliche Polymerpaare. Das am häufigsten untersuchte Paar ist

Polyallylaminhydrochlorid und Polystyrolsulfonat.^[194] Daneben wurden eine Vielzahl an synthetischen Polymeren, wie Polyethylenimin, Poly(diallyldimethylammoniumchlorid)^[195] und Polyacrylsäure,^[196] und Biopolymeren wie Dextransulfat,^[197] Chitosan bzw. Chitosansulfat,^[198] und Alginat^[199] verwendet. Die Übertragung der *Layer-by-Layer* Technik auf mikropartikuläre Systeme wurde maßgeblich von DONATH, MÖHWALD, CARUSO, DÄHNE, SUKHORUKOV, SHCHUKIN und DE GEEST^[200–203] vorangetrieben.

Ein Problem bei der Übertragung der *Layer-by-Layer* Technik von makroskopischen Oberflächen auf kolloidale Systeme ist es, die Stabilität der Nanopartikel zu erhalten. Die Zugabe von einem Polyelektrolyten entgegengesetzter Ladung zu der Partikel-Dispersion kann zu einer Brückenflockung oder Verminderungsflockung führen (Abbildung 2.4). Außerdem können überschüssige Polyelektrolyte, die nicht an der Partikeloberfläche adsorbiert sind, mit entgegengesetzt geladenen Polyelektrolyten Polyplexe bilden. Um diese Probleme zu minimieren, gibt es zwei Strategien. Zum Einen ist es möglich, die nichtadsorbierten Polymere von der Dispersion zu trennen. Hierfür eignen sich Dialysen oder die Zentrifugation. Entscheidende Nachteile sind die vergleichsweise langen Dialysezeiten und das Redispergieren zentrifugierter Nanopartikel. Aufgrund ihrer Größe müssen Nanopartikel bei hohen Beschleunigungen zentrifugiert werden. Dies kann Partikel beschädigen. Zum Redispergieren wird oft ein Ultraschalldispenser verwendet. Dessen Einsatz kann zu einer Erwärmung der Dispersion führen, so dass beim Einsatz von temperaturempfindlichen Substanzen wie zum Beispiel Nukleinsäuren auf eine ausreichende Kühlung zu achten ist. Eine weitere Möglichkeit zur Entfernung des freien Polymers ist die Filtrationsmethode. Hierbei wird die Dispersion mit einem für das Polymer durchlässigen aber für die Partikel undurchlässigen Filter filtriert. Nach Zugabe einer Waschlösung werden die Partikel vom Filter abgelöst, mit einer Polymerlösung entgegengesetzter Ladung versetzt und anschließend mit einem neuen Filter gereinigt. Nachteile dieser Methode sind das Finden eines geeigneten Filtermaterials und das Ablösen der Partikel vom Filter.

Diese Probleme lassen sich vermeiden, wenn beim *Layer-by-Layer* Verfahren die exakte zum Aufbau der neuen Polyelektrolytschicht benötigte Polymermenge zugegeben wird. Diese lässt sich über Umladungsexperimente ermitteln, bei denen unterschiedliche Mengen Polymer zu der Dispersion zugegeben werden und sowohl der hydrodynamische Durchmesser als auch das ζ -Potential bestimmt werden.

Die Darstellung von Hohlkapseln auf der Basis von PAH-stabilisiertem Calciumphosphat ist ebenfalls bekannt. Ein Vorteil dieses Polymers liegt in der im Vergleich zu Polyethylenimin niedrigen Transfektionseffizienz. Hierdurch wird ein möglicher Einfluss von Polyplexen, die bei der Synthese entstehen könnten, bei den zellbiologischen Experimenten reduziert. Ein weiterer Vorteil liegt in der geringen Permabilität für große Moleküle. So

haben PAH/PSS Schichten eine deutlich geringere Permeabilität als als PDADMAC/PSS-Kapseln.^[194] Somit bietet PAH potentiell einen besseren Schutz von Nukleasen beim Transport von DNA in die Zellen.

Die Darstellung von hohlen Strukturen ist für viele Materialien bekannt. So sind hohle Strukturen aus Metallen, wie zum Beispiel Gold^[204–206], Platin^[207,208], Kupfer^[209,210] oder Silber^[211–213], Oxiden, wie zum Beispiel Siliciumdioxid^[214–216], Salzen, wie Calciumphosphat^[95,217–219] und Polymeren^[133,220–222] bekannt.

Für die Darstellung von hohlen, nanoskopischen Strukturen gibt es unterschiedliche Ansätze. LOU *et al.* teilen die Syntheserouten in die vier Klassen *conventional hard templating synthesis*, *sacrificial templating synthesis*, *soft templating synthesis* und *template-free synthesis* ein.^[223] Bei der *conventional hard templating synthesis* werden im ersten Schritt Partikel dargestellt, die im zweiten Schritt oberflächenfunktionalisiert werden. Im dritten Schritt erfolgt die Abscheidung des Wandmaterials. Im letzten Schritt wird der Kern selektiv entfernt, um eine Kapsel zu erhalten.

Als Beispiel für die *soft templating synthesis* können die Verkapselung mit Polymervesikeln oder Emulsionstropfen angesehen werden. Bei der *sacrificial templating synthesis* dient das Templatmaterial als Reaktionspartner für den Schichtaufbau. Als Beispiel für die *template-free synthesis* kann das Entstehen von Hohlstrukturen durch eine *inside-out* OSTWALD-Reifung angesehen werden.

Die im Folgenden gezeigte Hohlkapseldarstellung kann als eine *conventional hard templating synthesis* angesehen werden.

5.2.2 Experimenteller Teil

5.2.2.1 Darstellung PAH-stabilsierter Calciumphosphatnanopartikel

Zur Darstellung der PAH-stabilisierten Calciumphosphatnanopartikel wurden ausgehend von SCHWIERTZ *et al.*^[133] je 5 mL einer *di*-Ammoniumhydrogenphosphatlösung mit einer Konzentration von $10,8 \text{ mmol L}^{-1}$, einer Calcium-*L*-lactatlösung mit einer Konzentration von 18 mmol L^{-1} und einer Polyallylaminhydrochloridlösung mit einer Massenkonzentration von 2 g L^{-1} mittels Peristaltikpumpe innerhalb von 1,5 Minuten in eine Wasservorlage mit einem Volumen von 20 mL gepumpt.

Der schematische Aufbau ist in Abbildung 5.5 dargestellt.

Die erhaltene Dispersion wurde mittels dynamischer Lichtstreuung und Messung des ζ -Potentials charakterisiert. Zur Entfernung des überschüssigen Polymers wurde die Dispersion in einem Dialyseschlauch mit einem *cut-off* von 100.000 Da drei Tage lang dialysiert.

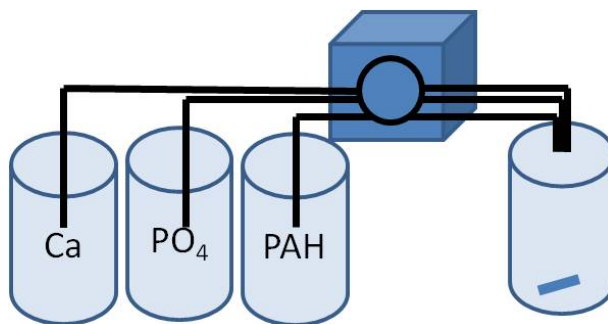


Abbildung 5.5: Schematischer Aufbau der Fällungsapparatur.

5.2.2.2 Umladung der Partikel

Zur Erzeugung anionischer Partikel wurde die Dispersion mit dem 7-fachen Volumen an Reinstwasser verdünnt. Anschließend erfolgte die Zugabe einer DNA-Lösung mit einer Massenkonzentration von 2 g L^{-1} . Der pH-Wert wurde vor Zugabe mit einer NH_3 -Lösung auf 10 eingestellt. Die DNA hatte eine Kettenlänge kleiner 50 Basenpaaren und eine molare Masse von etwa $10000 - 30000 \text{ g mol}^{-1}$.

Im letzten Schritt erfolgte die Zugabe von PAH, ohne die Dispersion vorher weiter zu verdünnen. Des Weiteren wurde eine DNA mit einer durchschnittlichen Kettenlänge von 2000 Basenpaaren verwendet. Im letzten Schritt erfolgte ebenfalls die Zugabe von PAH.

Zur Bestimmung der optimalen Mengen an zuzugebender DNA wurden $100 \mu\text{L}$ der PAH-stabilisierten Calciumphosphatdispersion mit $700 \mu\text{L}$ Reinstwasser verdünnt und in ein $1,5 \text{ mL}$ Eppendorfgefäß gegeben. Die Umladung erfolgte durch Zugabe von DNA-Lösung mit einer Konzentration von 1 g L^{-1} und anschließendes Vortexen. Im Anschluss wurde der hydrodynamische Radius der Partikel mittels dynamischer Lichtstreuung sowie das ζ -Potential bestimmt. Um eine für eine Umladung ausreichende DNA-Menge zu finden, bei der möglichst wenig freie DNA im Überstand bleibt, wurden unterschiedliche DNA-Mengen nach dem oben beschriebenen Methode zugegeben.

Zur Darstellung von fluoreszierenden Partikeln bzw. Kapseln wurden Calciumphosphat-Nanopartikel, die mit PAH stabilisiert waren, durch Zugabe von DNA (<50 Basenpaare) umgeladen. Anschließend erfolgte die Zugabe einer wässrigen Lösung von FITC-markiertem PAH. Die molare Masse betrug 15000 Da .

5.2.2.3 Kapseldarstellung

Zur Darstellung von Kapseln wurde der Calciumphosphat-Kern der mit zwei Schichten PAH und einer Schicht DNA umgebenen Partikel durch Ansäuern herausgelöst. Hierzu

wurde die Dispersion mit einer HCl-Lösung mit einer Konzentration von $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ versetzt und auf einen pH-Wert von etwa 2 gebracht. Anschließend erfolgte eine Dialyse in Gegenwart eines Kationenaustauschers (Serdolit Red). Nach einem Tag wurde der Kationenaustauscher gegen einen Anionenaustauscher (Serdolit Blue) ausgetauscht, und es wurde einen weiteren Tag lang dialysiert.

Die Calciumphosphat-Partikel, die mit siRNA bzw. EGFP-codierender DNA funktionalisiert wurden, wurden in eine QuixSep-Mikrodialysekapsel gegeben und mit einem 1 cm^2 -großen Stück Nadir-Dialyseschlauch verschlossen. Anschließend erfolgte eine Dialyse in Gegenwart von einem Anion- (Serdolit Blue) und einem Kationenaustauscher (Serdolit Red).

Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 5.6 gezeigt.

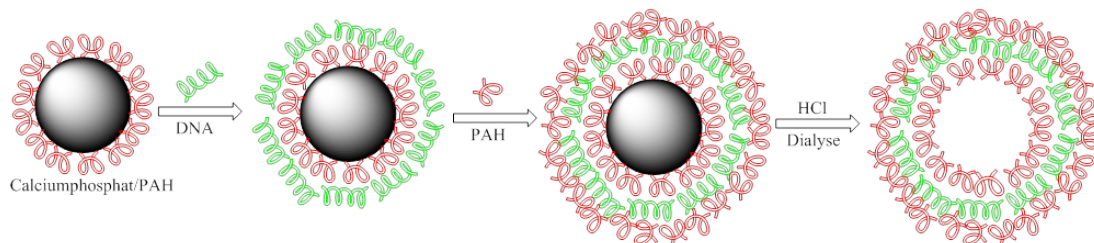


Abbildung 5.6: Schematische Darstellung der Synthese der PAH-DNA-PAH Kapseln.

Die erhaltenen Dispersionen wurde mittels dynamischer Lichtstreuung, Messung des ζ -Potentials, Rasterelektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie charakterisiert.

Die mit einer äußeren Schicht FITC-markiertem PAH beschichteten Kapseln wurden zusätzlich mittels Fluoreszenzspektroskopie charakterisiert.

5.2.2.4 Zellaufnahme

Zur Untersuchung der Zellaufnahme wurden die Partikel und Kapseln mit FITC-markiertem PAH in der äußeren Schicht sowie Polyplexe aus DNA und FITC-markiertem PAH zu HeLa-Zellen gegeben. Es wurden $40 \mu\text{L}$ der Dispersionen zu $500 \mu\text{L}$ Zellmedium gegeben. anschließend wurden $500 \mu\text{L}$ zu 50000 HeLa-Zellen gegeben. Nach 5 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen, und es erfolgte eine licht- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchung. Die Zellvitalität wurde mit einem MTT-Test bestimmt. Die zellbiologischen Arbeiten wurden von Frau M. Sc. Rotan durchgeführt.

5.2.2.5 Genstummschaltung

Für die Untersuchungen zur Genstummschaltung wurden die Partikel und Kapseln mit den gleichen Mengen und Konzentrationen wie in Abschnitt 5.2.2.2 beschrieben dargestellt. Abweichend von der oben beschriebenen Synthese wurde statt einer Modell-DNA mit 50 Basenpaaren siRNA verwendet. Als äußere Schicht wurde statt des FITC-markierten PAH mit einer molaren Masse von 15000 Da nicht-fluoreszierendes PAH mit einer molaren Masse von 56000 Da verwendet.

Zur Untersuchung der Genstummschaltungseffizienz wurden HeLa-Zellen mit Calciumphosphatpartikeln, Polymerkapseln und Polyplexen versetzt und 24 Stunden in einer 5 %-igen CO₂ Atmosphäre bei 37 °C inkubiert. Die zellbiologischen Arbeiten wurden von Frau M. Sc. Rotan durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie. Es wurden die fluoreszierenden und die nicht-fluoreszierenden Zellen in jeder Probe gezählt. Für alle Proben wurden mindestens 3 Bilder ausgewertet.

Die Auswertung erfolgte fluoreszenz- und lichtmikroskopisch durch den Vergleich von fluoreszierenden zu nicht-fluoreszierenden Zellen nach der Formel

$$\text{Effizienz} = \frac{(\text{Zellen}_{\text{nicht-fluoreszierend}}/\%) - (\text{Zellen der Kontrolle}_{\text{nicht-fluoreszierend}}/\%)}{\text{Zellen der Kontrolle}_{\text{nicht-fluoreszierend}}/\%}. \quad (5.1)$$

5.2.2.6 Transfektion

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden Calciumphosphatpartikel, Polymerkapseln und Polyplexe zu HeLa-Zellen gegeben. Als Positiv-Kontrolle wurde Lipofectamin verwendet.

Für die Experimente wurde EGFP-kodierende DNA eingesetzt. Es wurden 40 µL der Kapsel-, Partikel- und Polyplex-Dispersion zu je 500 µL Zellmedium gegeben. 500 µL dieser Dispersionen wurden zu 25000 HeLa-Zellen gegeben. Nach 7 Stunden wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden 72 Stunden bei 37 °C in einer 5 %-igen CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Proben mikroskopisch ausgewertet. Die Transfektionseffizienz wurde nach

$$\text{Transfektionseffizienz} = \frac{\text{Zellen}_{\text{fluoreszierend}}}{\text{Zellen}_{\text{gesamt}}} \quad (5.2)$$

berechnet. Die Zellvitalität wurde mittels MTT-Test bestimmt. Die zellbiologischen Arbeiten wurden von Frau M. Sc. Rotan durchgeführt.

5.2.3 Auswertung

5.2.3.1 Darstellung von Kapseln

Die Dispersionen wurden nach Umladung mittels dynamischer Lichtstreuung und Messung des ζ -Potentials gemessen. In Abbildung 5.7 sind die Intensitäts- und Anzahl-gewichteten Größenverteilungen für die Partikel mit unterschiedlichen Anzahlen von Polymerschichten aufgetragen. Die mit PAH stabilisierten Partikel weisen eine mittlere Größe von 140 nm auf. Das Maximum der Intensitäts-gewichteten Größenverteilung liegt bei 146 nm, das Maximum der Anzahl-gewichteten Größenverteilung bei 80 nm. Der Polydispersitätsindex beträgt 0,18. Nach Aufbringen einer DNA-Schicht liegt der mittlere Durchmesser bei 165 nm, das Maximum der Anzahl-gewichteten Größenverteilung bei 92 nm. Der Polydispersitätsindex beträgt 0,23. Durch Aufbringen einer äußeren Schicht aus FITC-markiertem PAH steigt der mittlere Durchmesser auf 170 nm. Die Maxima der Intensitäts-gewichteten und Anzahl-gewichteten Größenverteilung liegen bei 172 nm und 107 nm. Alle Dispersionen können somit als monodispers angesehen werden.

Ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der aufgebrauchten Schichten und dem hydrodynamischen Durchmesser ist nicht zu erkennen. Die Partikel mit einer Polymerschicht und die Partikel mit zwei Schichten haben eine nahezu identische Anzahl-gewichtete Größenverteilung. Lediglich bei den Partikeln mit zwei Schichten PAH und einer Schicht DNA ist eine Verschiebung des Maximums zu größeren Durchmessern zu beobachten. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass mittels dynamischer Lichtstreuung eine Intensitäts-gewichtete Größenverteilung aufgenommen wird und die Anzahl-gewichtete Größenverteilung eine aus den aufgenommenen Daten berechnete Messgröße ist. Außerdem wird mit der dynamischen Lichtstreuung der hydrodynamische Radius ermittelt, so dass auch ein eventuelles Quellen der Polymerschichten einen Einfluss auf die gemessene Größe hat. Die Schichtdicke der Polyelektrolytschichten ist schwer abzuschätzen. Für das lineare Schichtwachstum auf Oberflächen ist eine Schichtdicke von 1-3 nm pro Polymerschicht zu erwarten,^[224] SUKHORUKOV *et al.* berichteten von 2-3 nm dicken Schichten aus Polyallylaminhydrochlorid und Polystyrolsulfonat.^[201] VINOGRADOVA *et al.* berichten von 6-8 nm dicken DNA-Schichten und 2 nm - 3 nm dicken PAH Schichten für PAH/DNA Schichten.^[225] In Abbildung 5.8 sind die zu den in Abbildung 5.7 ermittelten Größen zugehörigen ζ -Potentiale aufgetragen. Von den Calciumphosphatpartikeln mit zwei Schichten PAH und einer Schicht DNA wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Eine repräsentative Aufnahme ist in Abbildung 5.10 dargestellt. Es sind deutlich einheitlich kugelförmige Partikel zu erkennen. Der Durchmesser von 15 zufällig ausgewählten Partikeln liegt zwischen 94 und 174 nm. Der durchschnittliche Durchmesser liegt bei 127 ± 24 nm

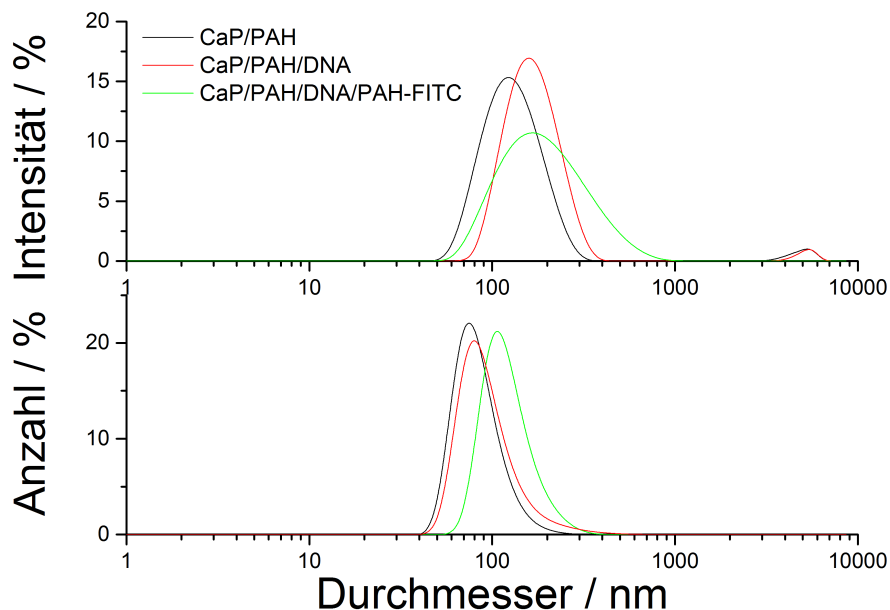


Abbildung 5.7: Mittels dynamischer Lichtstreuung ermittelte Größenverteilung von Calciumphosphat-Partikeln mit unterschiedlichen Polymerschichten.

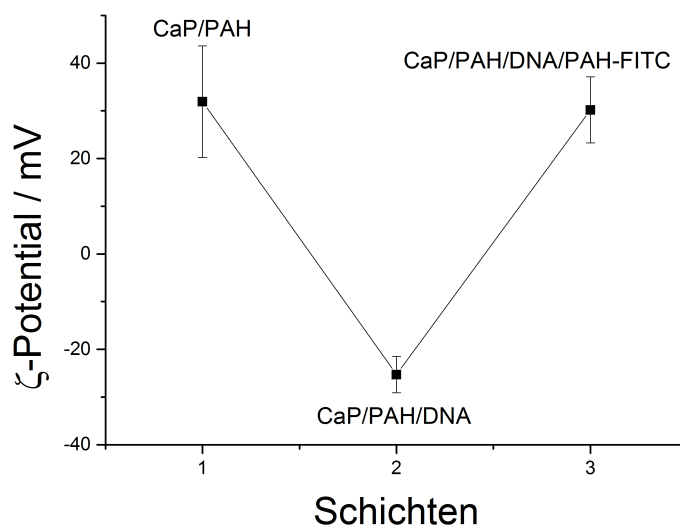


Abbildung 5.8: ζ -Potentiale von Calciumphosphat-Partikeln mit unterschiedlicher Anzahl Polymerschichten.

In Abbildung 5.9 sind die Intensitäts- und Anzahl-gewichteten Größenverteilungen der Calciumphosphatpartikeln, die mit zwei Schichten PAH und einer Schicht DNA stabilisiert wurden, und die Größenverteilungen der Kapseln nach Herauslösen des Calciumphosphat-

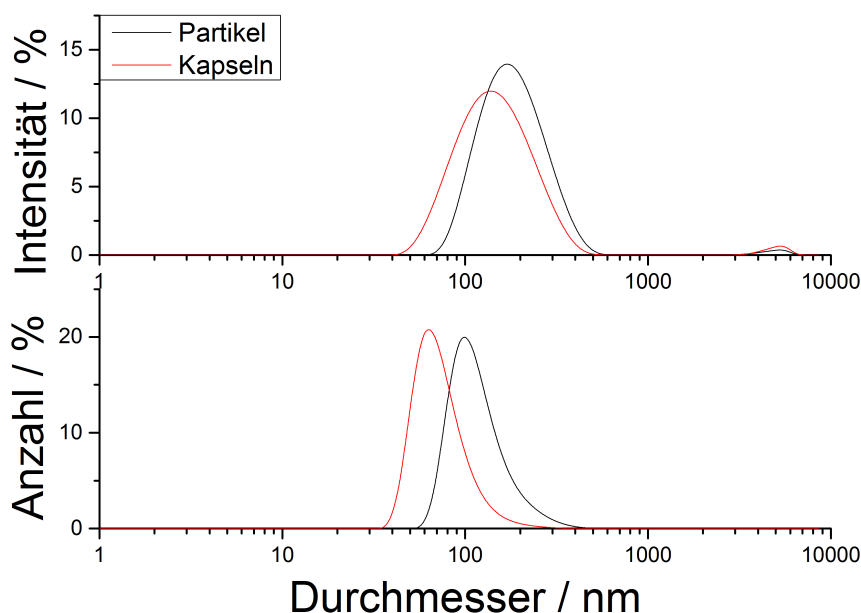


Abbildung 5.9: Mittels dynamischer Lichtstreuung ermittelte Intensitäts- (oben) und Anzahl-gewichtete (unten) Größenverteilung von Calciumphosphat mit zwei Schichten PAH und einer Schicht DNA (schwarz) und von den Polymerkapseln nach Herauslösen des Kerns (rot).

kerns gezeigt. Die Kapseln haben einen etwas geringeren hydrodynamischen Durchmesser als die Partikel mit massivem Kern. Eine mögliche Ursache hierfür kann in einem Zusammenziehen der Kapseln zur Verringerung der Oberfläche liegen. Durch die hohle Struktur ist es möglich, dass die Kapseln leicht kollabieren.

Von den Polymerkapseln mit herausgelöstem Kern wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Diese sind in Abbildung 5.11 dargestellt. Es sind in Abbildung A kugelförmige Partikel bei einer 20000-fachen Vergrößerung zu sehen. Der Durchmesser von 15 ausgewählten Partikeln ergibt eine Größenverteilung von 55 - 110 nm bei einem durchschnittlichen Durchmesser von 185 ± 55 nm. Das Ausmessen bei dieser Vergrößerung führt zu einem Messfehler von etwa 40 nm. Daher erfolgte ebenfalls eine Auswertung bei einer 80000-fachen Vergrößerung. In Abbildung 5.11B können 10 Kapseln identifiziert werden. Diese haben einen Durchmesser zwischen 79 und 200 nm. Der mittlere Durchmesser liegt bei 122 ± 39 nm. Der ablesebedingte Messfehler liegt bei etwa 10 nm. Von der Probe wurde ein energiedispersives Röntgenfluoreszenzspektrum aufgenommen. Dieses ist in Abbildung 5.12 dargestellt. Es ist bei einer Energie von 0,26 keV ein Signal für Kohlenstoff zu erkennen. Das Signal von Silicium ist auf die Probenpräparation auf einem Silicium-

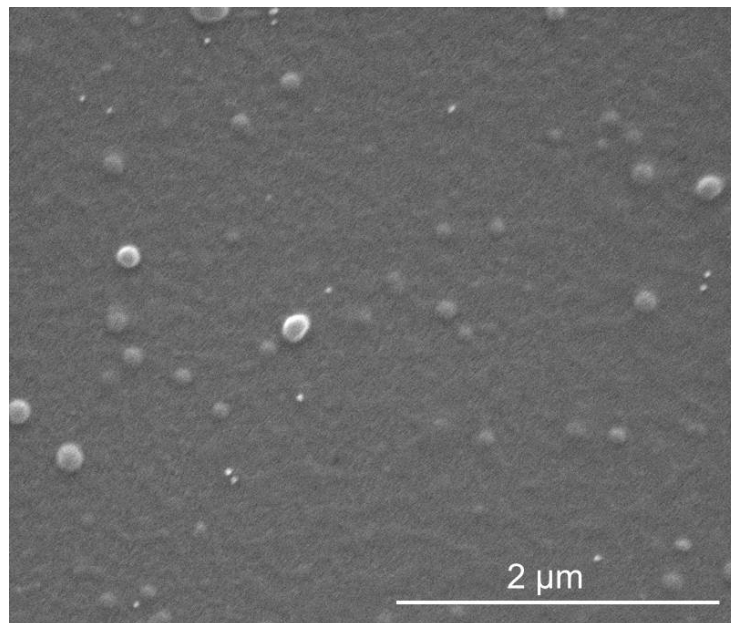


Abbildung 5.10: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Calciumphosphatpartikeln mit zwei Schichten PAH und einer Schicht DNA bei einer 30000-fachen Vergrößerung.

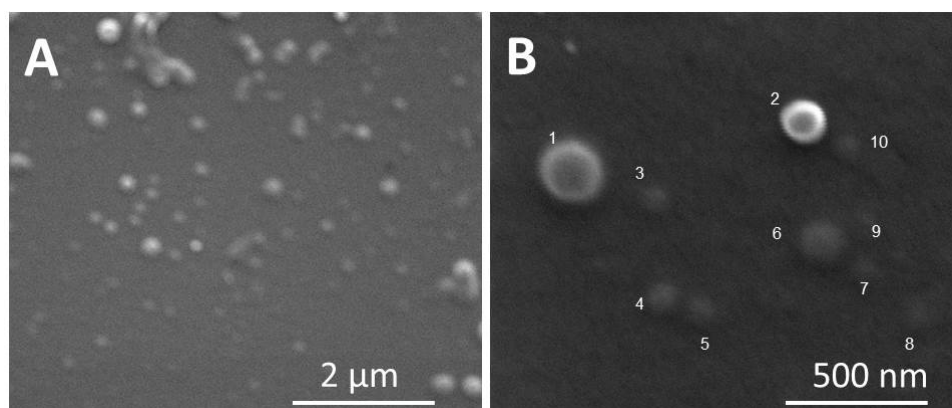


Abbildung 5.11: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von PAH-DNA-PAH Kapseln.

Probenträger zurückzuführen. Das Signal von Gold stammt vom Bedampfen der Probe zur Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit. Da kein Calcium bzw. Phosphor nachgewiesen werden kann, kann davon ausgegangen werden, dass die Ionen nach dem Herauslösen des Calciumphosphat-Kerns erfolgreich mittels Dialyse aus der Dispersion entfernt werden konnten. Der Vergleich mit den Partikeln vor dem Herauslösen des Calciumphosphatkerns zeigt die gleiche Morphologie. Bei den Durchmessern von Partikeln und Kapseln ist im Rahmen der Fehlergenauigkeit kein Unterschied zu erkennen. In beiden Proben liegt der

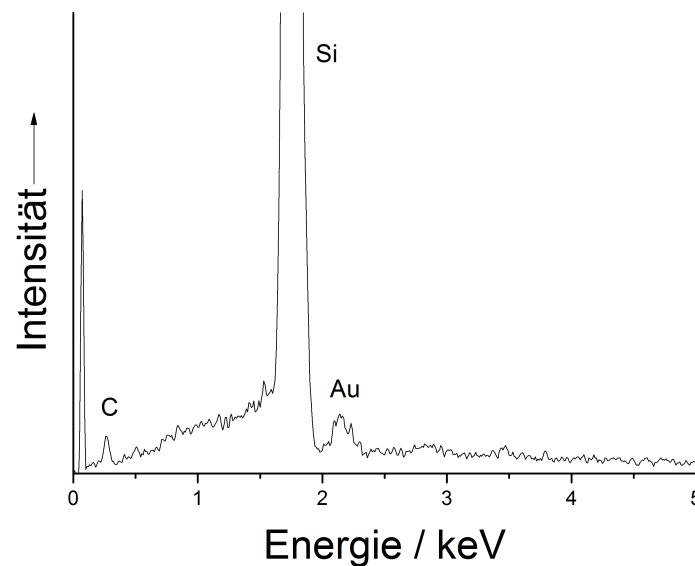


Abbildung 5.12: Energiedispersives Röntgenfluoreszenzspektrum von PAH-DNA-PAH Kapseln.

Durchmesser zwischen 100 und 200 nm. Dieser Befund ist konsistent mit der Literatur. In Arbeiten von SCHWIERTZ *et al.* wurden nanoskopische Calciumphosphat-Partikel mit kationischem PAH und anionischem Polystyrolsulfonat stabilisiert. Nach dem Herauslösen des Kerns durch Ansäuern der Dispersion konnten kugelförmige Kapseln dargestellt werden. Diese Kapseln wiesen einen mit den Partikeln vergleichbaren Durchmesser auf.^[133]

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen gestalteten sich schwierig, da die Strukturen unter Einwirkung des Elektronenstrahls zerstört wurden. In Abbildung 5.13 ist eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer bei Raumtemperatur getrockneten Kapsel-Dispersion dargestellt, an der zuvor Detailaufnahmen angefertigt wurden. Man erkennt deutlich den für die Detailaufnahme untersuchten Bereich am beschädigten Polymer. Zur mechanischen Charakterisierung und zum Nachweis einer hohlen Morphologie der Kapseln wurden die Partikel- und Kapsel-Dispersion mittels Rasterkraftmikroskopie untersucht.

Hierzu wurden 20 μL der Dispersionen auf einen Glasobjektträger getropft und bei Raumtemperatur getrocknet.

Die rasterkraftmikroskopische Untersuchung erfolgte im *non-contact-mode*.

In Abbildung 5.14 sind exemplarische Aufnahmen der Nanoindentation von Calciumphosphatnanopartikeln, die mit zwei Schichten PAH und einer Schicht DNA ummantelt wurden, dargestellt. Auf der linken Seite von Abbildung 5.14 (a, c, e) ist ein Partikel vor

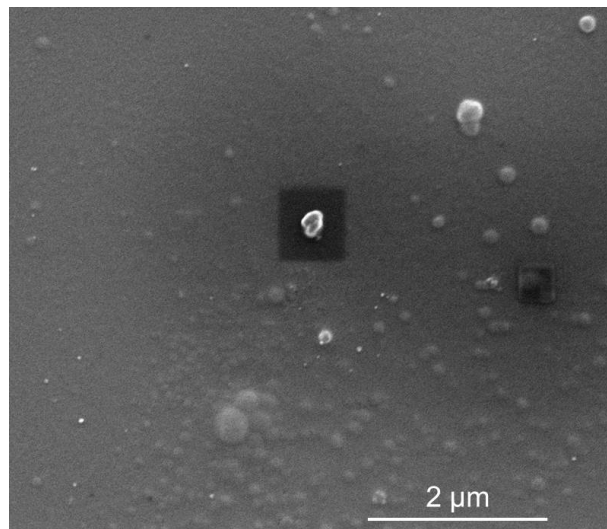


Abbildung 5.13: Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme eines Bereiches der Probe, in dem zuvor Detailaufnahmen angefertigt wurden.

dem Eindrücken, auf der rechten Seite das gleiche Partikel nach dem Eindrücken mittels AFM-Spitze dargestellt (Abbildung 5.14 b, d f). In der Mitte der Abbildung (c, d) ist eine 3-dimensionale Darstellung des Partikels gezeigt. In Abbildung 5.14 e) und f) sind die Höhenprofile einer *cross-section* des Partikels vor und nach Indentation dargestellt.

Es ist ein kugelförmiges Partikel zu erkennen. Der Durchmesser beträgt etwa 200 nm. Im Höhenprofil ist zu erkennen, dass die Höhe der Partikel etwa 60 nm beträgt.

Der Vergleich des Partikels vor und nach Eindrücken mittels einer AFM-Spitze zeigt eine leichte Deformation der Oberfläche, wobei die eigentliche Struktur erhalten bleibt.

In Abbildung 5.15 ist die rasterkraftmikroskopische Aufnahme eines Partikels nach Ansäuern mittels HCl und anschließender Dialyse in Gegenwart von Kationen- und Anionenaustauschern dargestellt.

Abbildung 5.15 a und b zeigen die exemplarische Aufnahme einer Kapsel vor bzw. nach dem Herauslösen des Calciumphosphatkerns mittels verdünnter HCl. In Abbildung 5.15 c und d sind die zugehörigen 3-D-Darstellungen zu erkennen. Es zeigt sich, dass die Behandlung mit Salzsäure keinen Einfluss auf die Morphologie der Partikel hat. Es ist ein kugelförmiges Partikel mit einem Durchmesser von etwa 200 nm zu erkennen. Das Eindrücken der Kapsel führt zu einer deutlichen Änderung der Morphologie. Das Partikel weist nach dem Eindrücken eine deutliche Deformation auf, die zu einem Verlust der ursprünglichen Form führt. Im Höhenprofil (Abbildung 5.15 f) ist deutlich zu erkennen, dass durch das Eindrücken ein Loch bis zur Unterseite der Kapsel entsteht.

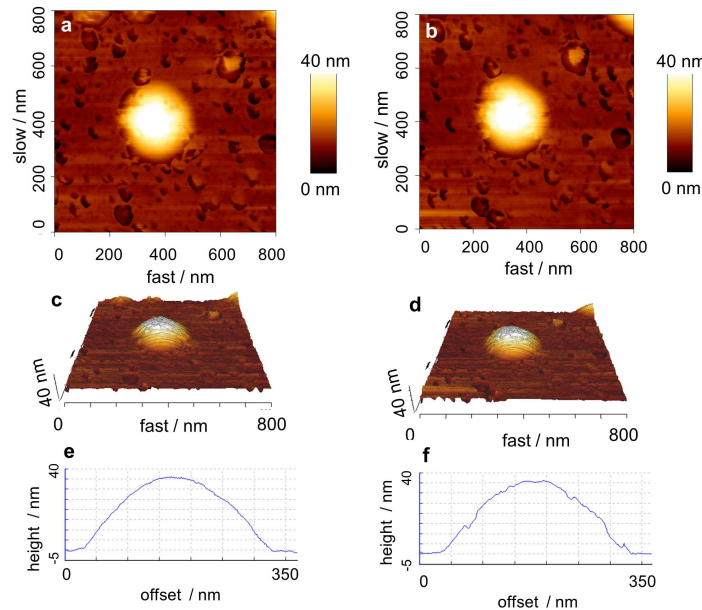


Abbildung 5.14: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von Calciumphosphatpartikeln vor (a, c) und nach dem Eindringen (b, d) mittels AFM-Spitze sowie die zugehörigen Höhenprofile vor (e) und nach (f) dem Eindringen

Es kann somit davon ausgegangen werden, dass durch das Ansäuern der Calciumphosphatpartikel, die mit zwei Schichten PAH und einer Schicht DNA umhüllt waren, und die anschließende Dialyse in Gegenwart von Ionenaustauschern der anorganische Kern entfernt wurde. Es entstanden hohle Kapseln, die nach außen hin durch die Polyelektrolyten stabilisiert wurden.

5.2.3.2 Zellaufnahme

Zur Untersuchung der Zellaufnahme von Calciumphosphatpartikeln, die mit je zwei Schichten PAH und einer Schicht DNA stabilisiert wurden, bzw. von Polymerkapseln nach Herauslösen des Calciumphosphat-Kerns im sauren Medium und Dialyse, wurden Partikel und Kapseln verwendet, die als äußere Schicht FITC-markiertes PAH enthielten (5.2.2.2). Die Kapseldispersion wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht. Das Absorptionsspektrum ist in Abbildung 5.16 dargestellt. Bei einer Wellenlänge von 498 nm ist das für FITC charakteristische Absorptionsmaximum zu erkennen. Das gemessene Absorptionsmaximum stimmt sehr gut mit der Literatur überein.^[226]

In Abbildung 5.17 ist ein Fluoreszenzspektrum der Probe bei einer Anregungswellenlänge

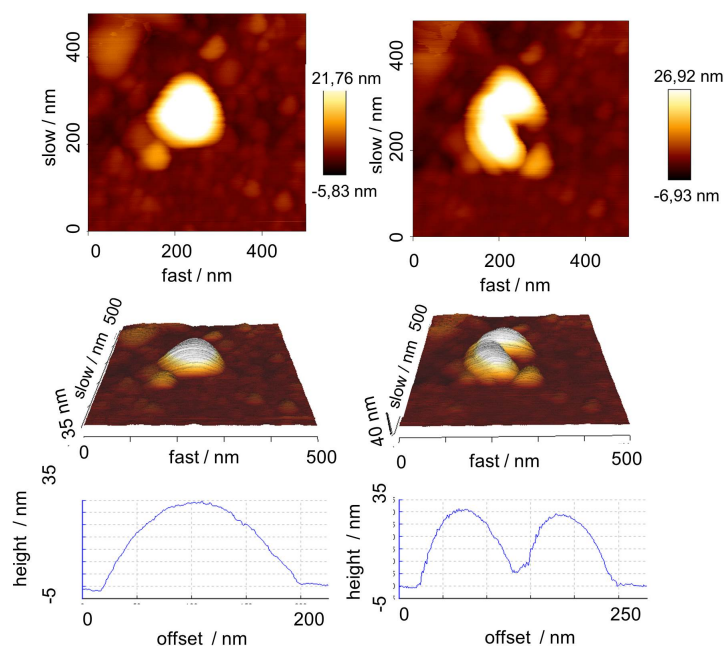


Abbildung 5.15: Rasterkraftmikroskopische Aufnahme von Polymerkapseln, die durch Herauslösen des Kerns mit HCl aus Calciumphosphatpartikeln mit je 2 Schichten PAH und einer Schicht DNA, dargestellt wurden. a) Kapsel vor dem Eindrücken, b) Kapsel nach dem Eindrücken, c) 3-D-Darstellung der Kapsel vor dem Eindrücken, d) 3-D-Darstellung der Kapsel nach dem Eindrücken, Höhenprofil der Kapsel vor (e) und nach dem Eindrücken (f) mittels AFM-Spitze.

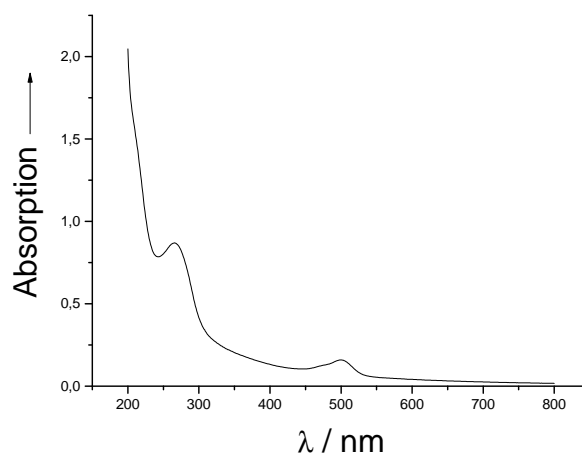


Abbildung 5.16: UV/Vis-Spektrum von PAH-DNA-PAH Kapseln mit einer äußeren Schicht aus FITC-markiertem PAH.

von 480 nm dargestellt.

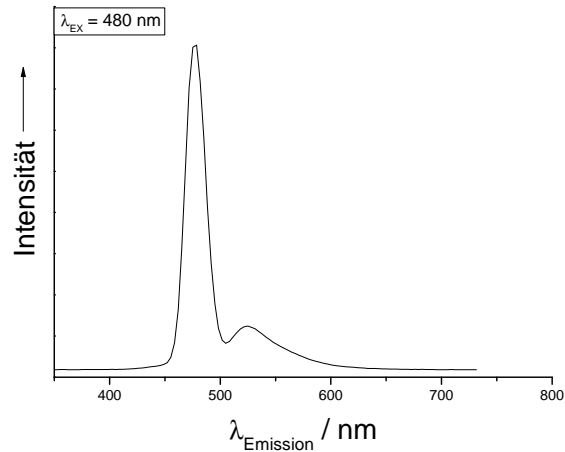


Abbildung 5.17: Fluoreszenzspektrum von PAH-DNA-PAH Kapseln mit einer äußeren Schicht aus FITC-markiertem PAH bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 480$ nm.

Die Streustrahlung der Anregungswellenlänge ist deutlich zu erkennen. Daneben zeigt sich eine Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 524 nm. Diese Wellenlänge ist typisch für FITC. ^[226,227]

Zur Untersuchung der Zellaufnahme wurden HeLa-Zellen mit Partikel- und Kapsel-Dispersion versetzt und sechs Stunden in einer 5 %-igen CO_2 -Atmosphäre bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, anschließend erfolgte die licht- und fluoreszenzmikroskopische Auswertung.

Des Weiteren wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt.

Als Kontrollprobe wurden Polyplexe aus PAH, DNA und FITC-markiertem PAH verwendet. Die Konzentrationen entsprachen den für die Partikel eingesetzten Konzentrationen. In Abbildung 5.18 sind die fluoreszenz- und lichtmikroskopischen Aufnahmen dargestellt. Die linke Spalte zeigt die lichtmikroskopischen Aufnahmen, die mittlere Spalte die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme und die rechte Spalte die übereinander gelegten Bilder. Es zeigte sich, dass die Polyplexe nur schlecht aufgenommen wurden. Die Polymerkapseln und Calciumphosphat-Partikel wurden gut aufgenommen. In diesen beiden Proben ist eine deutliche Fluoreszenz in den Zellen zu erkennen. Des Weiteren sind auch einige Fluoreszenzzentren sichtbar, die auf an der Gefäßwand adhärierte Partikel bzw. Kapseln zurückzuführen sind. In den Zellen ist die Fluoreszenzintensität jedoch deutlich höher. Ein Unterschied in der Zellaufnahme von Partikeln oder Kapseln ist nicht zu erkennen. Die Zellvitalität wurde mittels MTT-Test ermittelt. Die Vitalitäten der mit Partikel-,

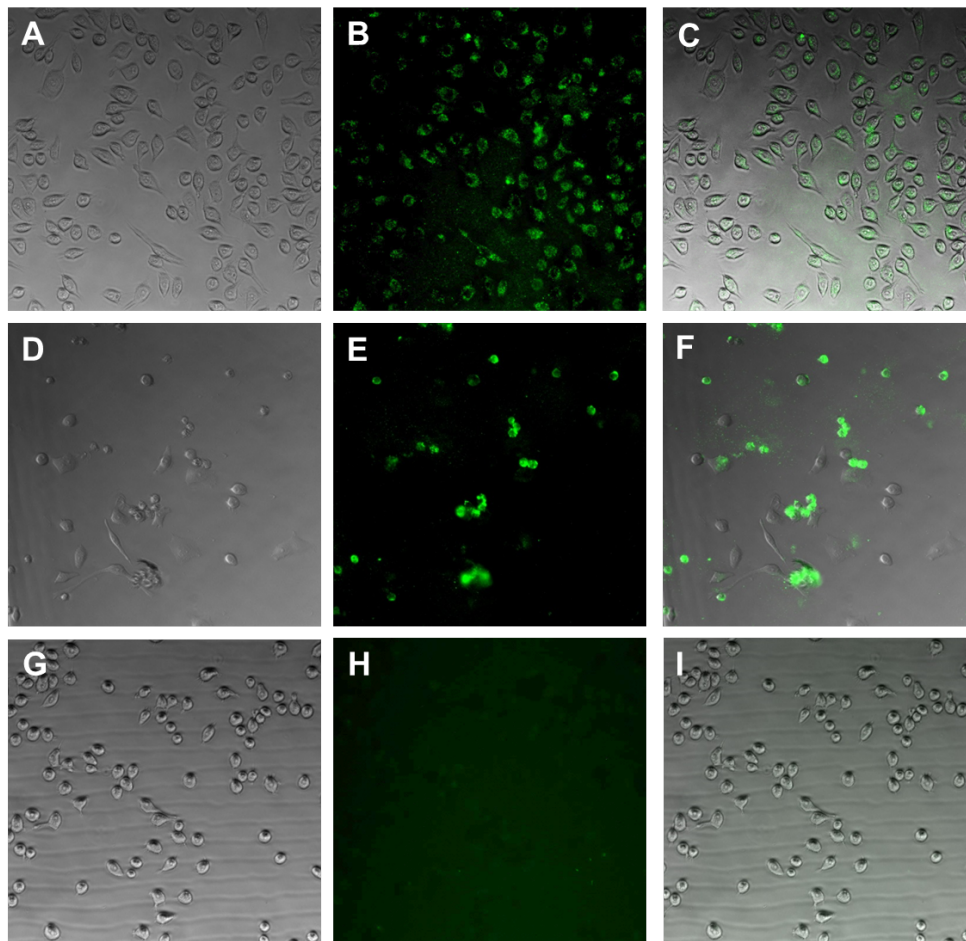


Abbildung 5.18: Licht- und fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen nach Inkubation mit Partikel- (a-c), Kapsel- (d-f) und Polyplex-Dispersion (g-i).

Kapsel- und Polyplexdispersion inkubierten Zellen sind in Abbildung 5.19 aufgeführt. Im Rahmen der Fehlergrenzen ist kein signifikanter Unterschied in der Zellvitalität zu erkennen. Für die mit Kapseldispersion versetzte Probe beträgt sie $99 \pm 3 \%$, für die mit Calciumphosphatpartikeln $104 \pm 6 \%$ und für die Proben nach Inkubation mit Polyplexen $103 \pm 7 \%$. Somit sind die Dispersionen in den verwendeten Konzentrationen nicht zytotoxisch.

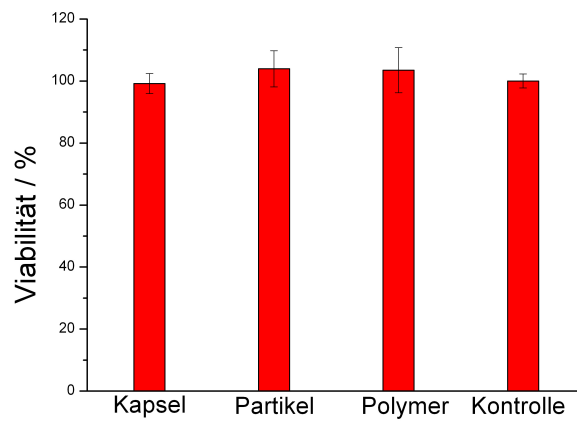


Abbildung 5.19: Vitalitäten von HeLa-Zellen nach Inkubation mit Polyplexen, Polymerkapseln und Calciumphosphatpartikeln.

5.2.3.3 Genstummschaltung

Für die Experimente wurde die Partikel- und Kapseldarstellung mit den oben beschriebenen Konzentrationen durchgeführt. Abweichend wurde statt der DNA siRNA (siRNA (anti-EGFP, sense-Strang: 5'-GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU-3' und antisense-Strang: 5'-AUGAACUUCAGGGUCAGCUUGC-3', Invitrogen) verwendet. Als äußere Schicht wurde Polyallylaminhydrochlorid mit einer molaren Masse von 56000 Da verwendet. In Abbildung 5.20 sind die ζ -Potentiale der Partikel nach Aufbringen der unterschiedlichen Polymer-Schichten dargestellt. Die ζ -Potentiale liegen bei 43 ± 6 mV, -34 ± 6 mV und

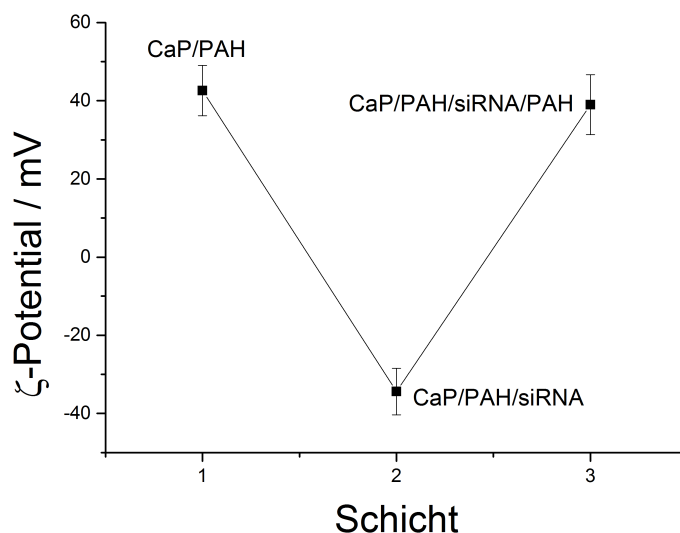


Abbildung 5.20: ζ -Potentiale von Calciumphosphat-Partikeln mit unterschiedlichen Polymerschichten.

39 ± 8 mV. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass der Schichtaufbau erfolgreich verlaufen ist.

Das Maximum der Intensitäts-gewichteten Größenverteilung liegt für die mit PAH stabilisierten und die mit DNA umgeladenen Calciumphosphat-Partikel bei 130 nm, die mit einer Schicht siRNA und zwei Schichten PAH stabilisierten Partikel haben das Maximum bei 170 nm. (Abbildung 5.21)

In der Anzahl-gewichteten Darstellung ist ein ähnlicher Trend zu erkennen. Die mit einer und zwei Schichten ummantelten Partikel haben Maxima bei 70 nm und 80 nm. Die mit drei Polymerschichten ummantelten Partikel sind mit 120 nm größer (Abbildung 5.21).

Die Polydispersitätsindices betragen 0,18 für die mit PAH stabilisierten Partikel, 0,10 für die mit siRNA umgeladenen Partikel und 0,13 für die Partikel mit einer äußeren Schicht

PAH. Alle Dispersionen können somit als monodispers angesehen werden.

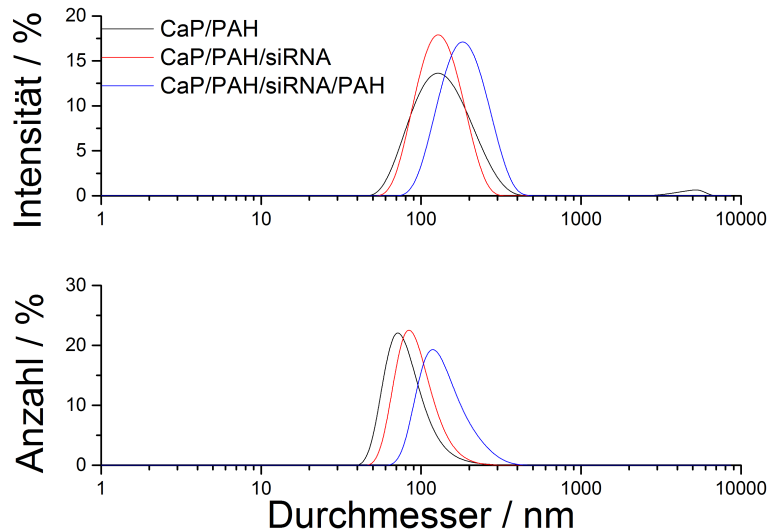


Abbildung 5.21: Intensitäts-(oben) und Anzahl-gewichtete (unten) Größenverteilung von Calciumphosphat-Partikeln mit unterschiedlichen Polymerschichten.

Eine mittels Rasterelektronenmikroskopie aufgenommene Übersichtsaufnahme der 3-schichtigen Kapseln nach Ansäuern und Dialyse ist in Abbildung 5.22 dargestellt. Man erkennt bei der 100000-fachen Vergrößerung einheitlich runde Partikel. Die Größenbestimmung von 20 Partikeln liefert eine durchschnittliche Größe von 58 ± 11 nm, das Maximum liegt bei 80 nm, der Median liegt bei 58 nm. Die Größenverteilung ist in Abbildung 5.23 dargestellt. Die Unterschiede in den mit dynamischer Lichtstreuung und Rasterelektronenmikroskopie ermittelten Größenverteilungen sind zum Einen auf die unterschiedlichen Messmethoden zurückzuführen. Zum Anderen ist es möglich, dass die Kapseln in Dispersion gequollen und durch die Messung im Vakuum kollabiert sind. Zur Bestimmung der Genstumschaltungseffizienz wurden fluoreszenz- und lichtmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Repräsentative *overlay*-Bilder sind in Abbildung 5.24 dargestellt. Die Auswertung erfolgte nach Gleichung 5.1 aus 9 Bildern.

In Abbildung 5.25 sind die Genstumschaltungseffizienzen graphisch dargestellt. Sie liegen bei 76 ± 16 % für die Kapseln, 76 ± 12 % für die Partikel und 51 ± 17 % für die Polymerkontrolle. Im Rahmen der Fehlergrenzen ist kein signifikanter Unterschied zwischen Kapseln, Partikeln und Kontrolle zu erkennen.

Dieser Befund ist insofern ungewöhnlich, da die Untersuchungen zur Zellaufnahme keine Aufnahme der Kontrollprobe aus den verwendeten Polymeren gezeigt hat. Eine mögliche

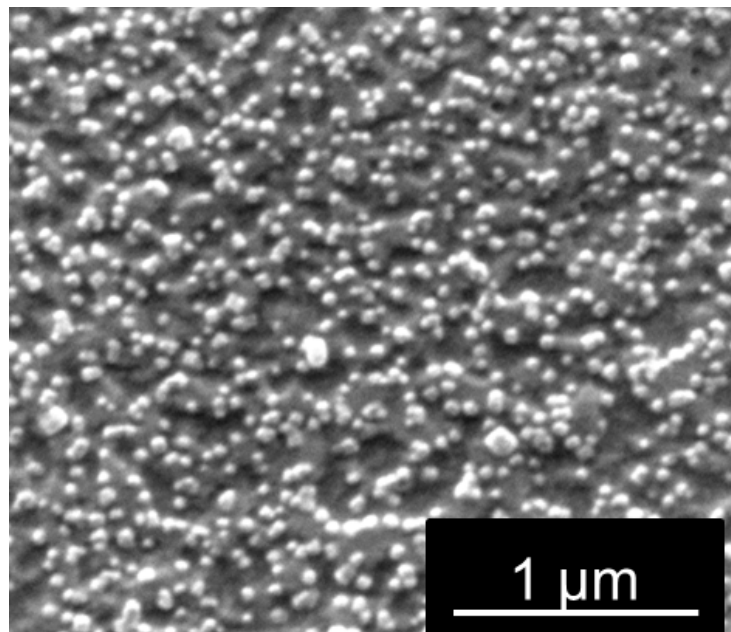


Abbildung 5.22: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Calciumphosphat-Partikeln mit PAH stabilisiert, siRNA funktionalisiert und PAH umgeladen wurden.

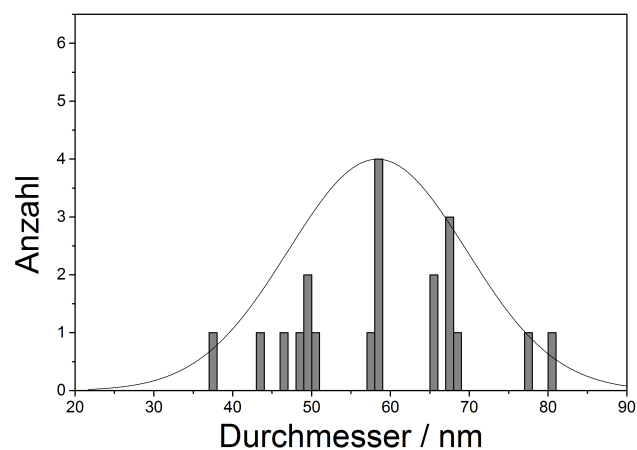


Abbildung 5.23: Mittels Rasterelektronenmikroskopie ermittelte Größenverteilung von Calciumphosphat-Partikeln mit zwei Schichten PAH und einer Schicht siRNA.

Ursache liegt in der unterschiedlichen Inkubationsdauer. Die Proben für die Untersuchungen zur Zellaufnahme wurden 7 Stunden mit den Proben versetzt, anschließend gewaschen und mikroskopisch ausgewertet. Die Versuche zur Genstummschaltung wurden 48 Stunden inkubiert. Nach 7 Stunden wurde das Zellmedium gewechselt und durch neues Zellmedium

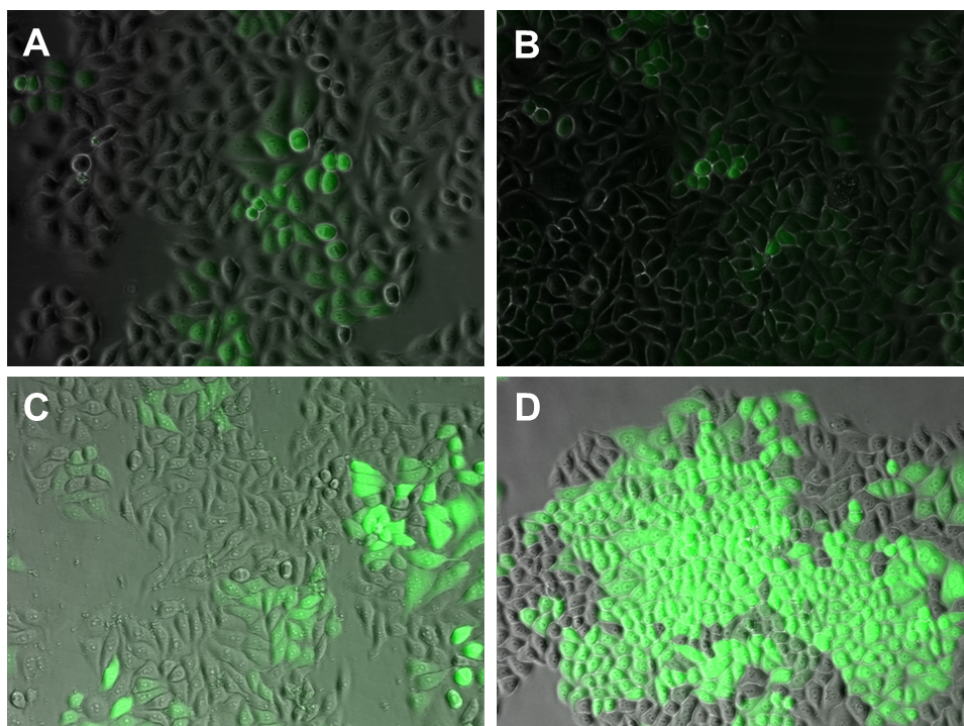


Abbildung 5.24: Mikroskopische Aufnahmen von HeLa-EGFP-Zellen nach Inkubation mit Calciumphosphat/PAH/siRNA/PAH-Partikeln (A), PAH/siRNA/PAH-Kapseln (B), PAH/siRNA-Polyplexen (C) und unbehandelten Zellen (D).

ersetzt.

Weiterhin sind die starken Standardabweichungen in den Einzelproben zu beachten. Die Untersuchung der Zellvitalität mittels MTT-Test (Abbildung 5.26) zeigt keinen Unterschied zwischen den einzelnen Proben im Rahmen der Fehlergrenzen. Die Zellvitalität liegt nach Inkubation mit Partikeln bei $110 \pm 12 \%$, mit Kapseln bei $102 \pm 5 \%$ und nach Inkubation mit der Kontrollprobe bei $108 \pm 9 \%$, bezogen auf nicht inkubierte Proben. Die verwendeten Proben sind somit in der verwendeten Konzentration nicht zytotoxisch.

5.2.3.4 Transfektion

Aufgrund der höheren molaren Masse von EGFP-codierender DNA im Vergleich zu der in den Genstummschaltungsversuchen verwendeten siRNA wurde durch Zugabe unterschiedlicher DNA-Mengen zu den PAH-stabilisierten Calciumphosphat-Partikeln die notwendige Menge für eine Umladung bestimmt. Hierzu wurden unterschiedliche Volumina DNA-Lösung zu je 1 mL der Calciumphosphat-Dispersion gegeben. Die so erhaltenen Dispersionen wurden mittels dynamischer Lichtstreuung und Messung des ζ -Potentials cha-

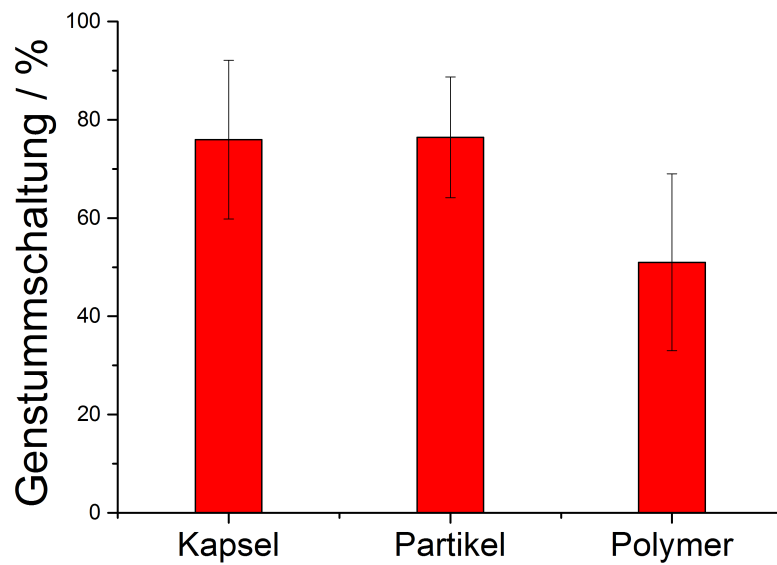


Abbildung 5.25: Genstummschaltungseffizienz von Dispersionen aus Calciumphosphat/PAH/siRNA/PAH-Partikeln, PAH/siRNA/PAH-Kapseln und PAH/siRNA-Polyplexen.

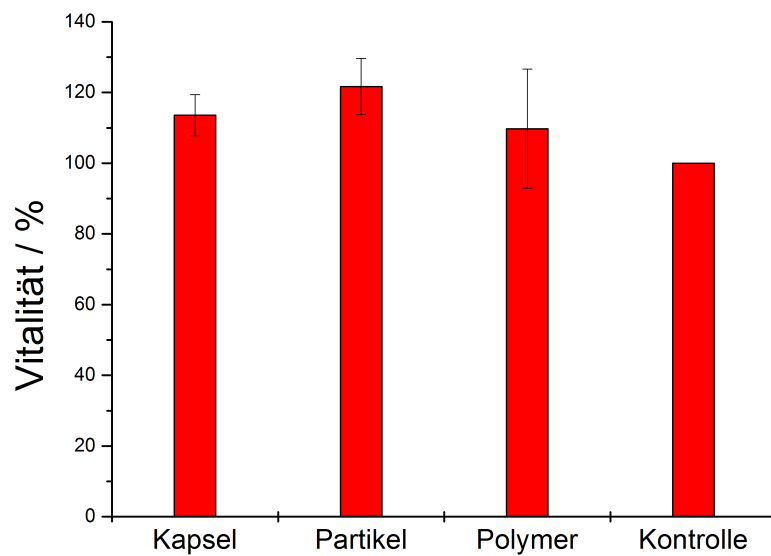


Abbildung 5.26: Zellvitalität der Proben zur Bestimmung der Genstummschaltungseffizienz.

rakterisiert. In Abbildung 5.27 sind die ζ -Potentiale in Abhängigkeit von der zugegebenen DNA-Menge für eine DNA mit einer Kettenlänge von 2000 Basenpaaren dargestellt. Man erkennt eine typische Umladungskurve. Bei Zugabe einer geringen Menge DNA wird die kationische Oberfläche nicht vollständig bedeckt. Dies führt zu einer geringen Änderung des ζ -Potentials. Beim Aufbau einer DNA-Schicht kommt es zur Umladung des Systems. Eine weitere Zugabe an DNA führt zu keiner weiteren Änderung des ζ -Potentials, da eine Sättigung erreicht wird. Die zugegebene DNA befindet sich frei in Dispersion und ist nicht an die Partikeloberfläche adsorbiert.

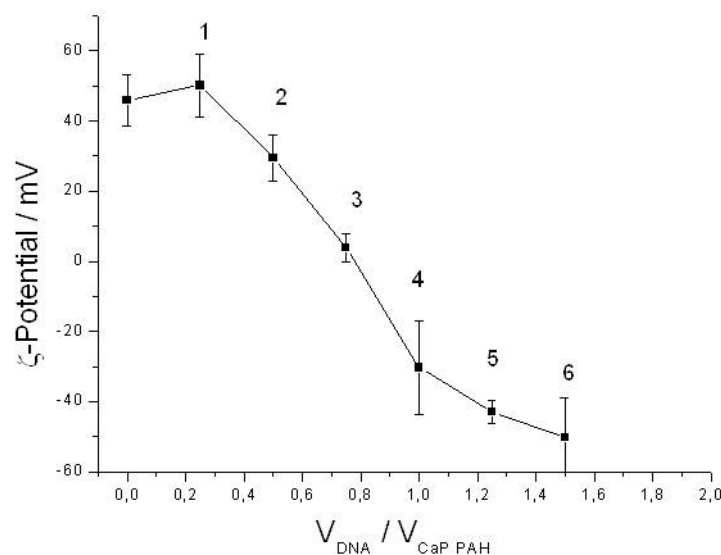


Abbildung 5.27: ζ -Potential von PAH-stabilisiertem Calciumphosphat nach Zugabe unterschiedlicher Mengen DNA.

In Abbildung 5.28 sind die Intensitäts-gewichteten Größenverteilungen der Proben 1, 3 und 5 dargestellt. Bei Probe 1 liegt lediglich eine Dotierung der kationischen Partikel mit DNA vor. Das ζ -Potential ist stark positiv, so dass von einer elektrostatischen Stabilisierung der Partikel ausgegangen werden kann. Dies wird durch die monodisperse Größenverteilung bestätigt. In Probe 3 ist so viel DNA zugegeben, dass das ζ -Potential auf null fällt. Die Partikel sind nicht mehr elektrostatisch stabilisiert. Es kommt zur Aggregation. In der Größenverteilung ist eine polydisperse Größenverteilung zu erkennen. Durch die Zugabe einer höheren DNA Menge in Probe 5 wird eine vollständige Schicht aufgebracht, so dass es zur Umladung der Partikel kommt. Die Partikel weisen eine monodisperse Größenverteilung auf, da wieder eine elektrostatische Stabilisierung vorliegt.

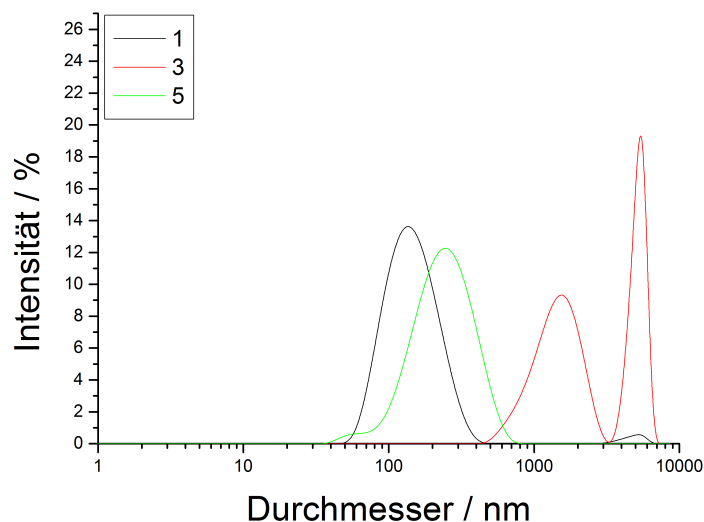


Abbildung 5.28: Größenverteilung der Proben 1, 3 und 5 aus der in Abbildung 5.27 dargestellten Umladung von PAH-stabilisiertem Calciumphosphat mit DNA.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden die mit EGFP-kodierender DNA funktionalisierten Partikel dargestellt. Es wurde 1 mL der verdünnten Calciumphosphat-Dispersion mit 10 μ L DNA versetzt und anschließend mit 30 μ L PAH-Lösung umgeladen. Die Darstellung von Kapseln erfolgte analog zu den oben beschriebenen Versuchen. In Abbildung 5.29 ist eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Kapseln nach Dialyse dargestellt. Man erkennt sehr gut monodisperse kugelförmige Partikel.

Die Partikel sind jedoch sehr empfindlich und werden durch den Elektronenstrahl beschädigt. In Abbildung 5.30 ist eine Aufnahme von Kapseln, die durch die Probenpräparation und die Einwirkung des Elektronenstrahls kollabiert sind, gezeigt. Es sind nur noch einige kugelförmige Partikel zu erkennen. Die roten Pfeile in der Abbildung markieren Bereiche, in denen aufgeplatzte Kapseln zu sehen sind. Hier sind die Kapsel-Schalen mit Löchern zu erkennen. Dies ist neben den Eindrückversuchen mittels Rasterkraftmikroskopie ein weiterer Beleg für die hohle Morphologie nach Ansäuern und Dialyse der Partikel.

Die Partikel, Kapseln und Polyplexe wurden für Transfektionsexperimente mit HeLa-Zellen inkubiert. Die Auswertung erfolgte licht- und fluoreszenzmikroskopisch. Als Kontrolle wurde das kommerzielle Transfektionsmittel Lipofectamin verwendet. In Abbildung 5.31 sind *overlay*-Aufnahmen von Zellen nach Inkubation mit Kapseln, Partikeln und Polyplexen dargestellt. Es zeigt sich, dass das Verhältnis von fluoreszierenden zu nicht-fluoreszierenden Zellen bei den mit Kapseln und Partikeln transfizierten Proben höher ist

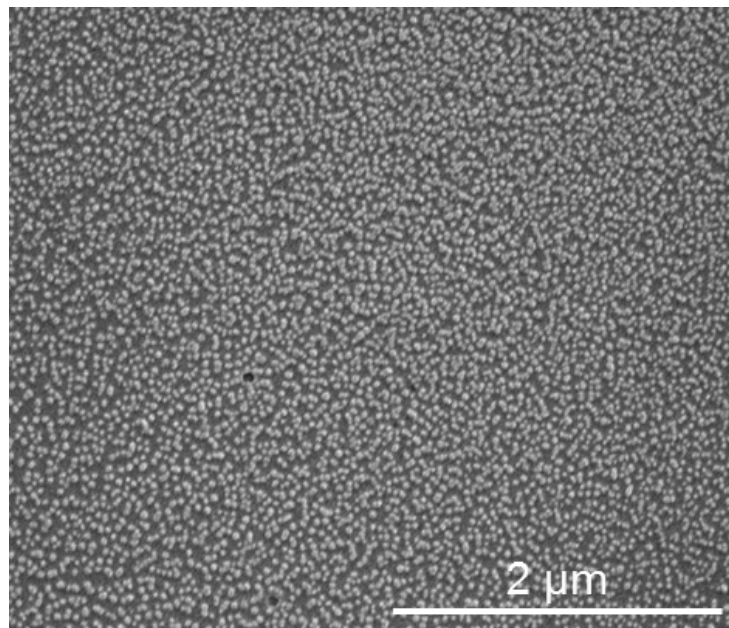


Abbildung 5.29: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Polymerkapseln aus einer Schicht EGFP-codierender DNA und zwei Schichten PAH.

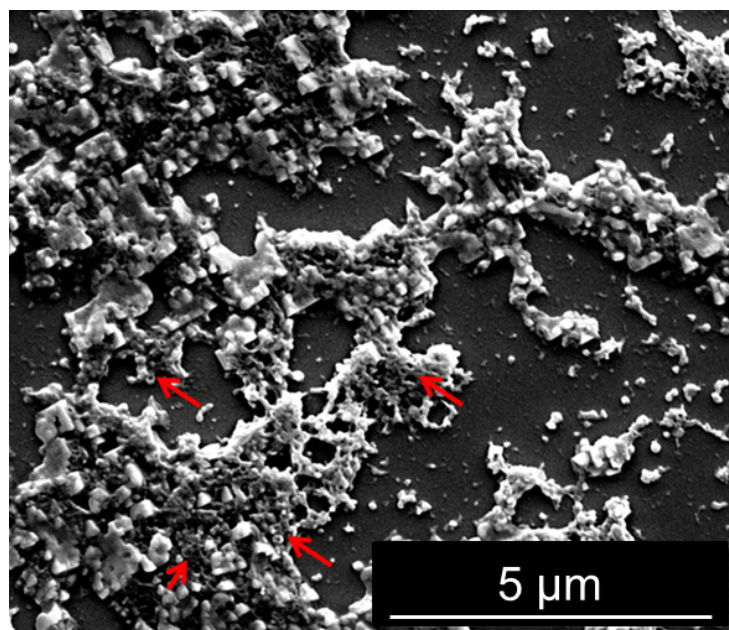


Abbildung 5.30: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von PAH/DNA/PAH Kapseln, die durch die Probenpräparation und Einwirken des Elektronenstrahls kollabiert sind. Die roten Pfeile markieren Bereiche, in denen aufgeplatzte Kapseln zu sehen sind.

als bei den mit Polyplexen transfizierten Zellen.

Die Transfektionseffizienz wurde nach Formel 5.2 bestimmt. Sie lag für die mit Partikeln

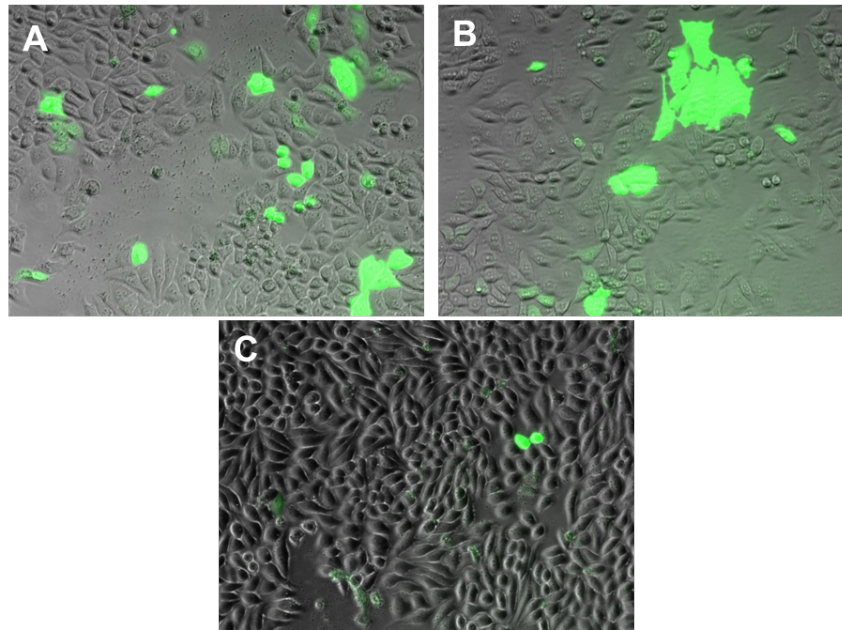


Abbildung 5.31: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen nach Transfektion Calciumphosphat/PAH/EGFP-DNA/PAH-Partikeln (A), PAH/EGFP-DNA/PAH-Kapseln (B) und PAH/EGFP-DNA-Polyplexen (C).

inkubierten Proben bei $11 \pm 1\%$, für die mit Kapseldispersion inkubierten Proben bei $8 \pm 3\%$ und für die Polyplexe bei $\pm 1\%$. Die Kontrolle mit Lipofectamin zeigte eine höhere Transfektionseffizienz. Sie lag bei $70 \pm 5\%$. Die Transfektionseffizienzen sind in Abbildung 5.32 gezeigt. Die vergleichsweise hohe Transfektionseffizienz von Lipofectamin geht mit einer sehr hohen Zytotoxizität einher. Die mittels MTT-Test ermittelte Vitalität liegt bei $11 \pm 8\%$. Die Partikel zeigten mit $104 \pm 13\%$ genauso wie die Polyplexe mit $107 \pm 9\%$ keinen toxischen Effekt. Die Zellvitalität der mit den Kapseln inkubierten Proben ist mit $80 \pm 7\%$ niedriger. Die Vitalitäten sind in Abbildung 5.33 aufgetragen. Eine Erklärung für die geringere Vitalität der Zellen nach Inkubation mit den Kapseln kann nicht gegeben werden. In den Experimenten zur Genstummschaltung und Zellaufnahme war kein Unterschied in der Vitalität zu beobachten. Einen Unterschied machen nur die verwendeten Nukleinsäuren. Es zeigt sich aber in den Experimenten, dass die EGFP-codierende DNA durch die Kapseldarstellung in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt wird.

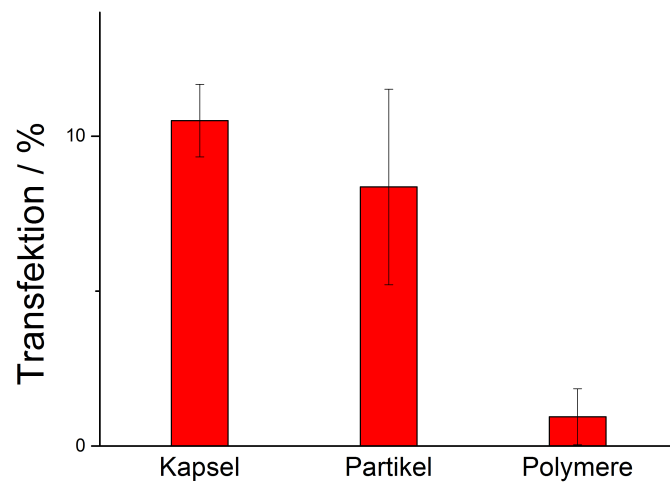


Abbildung 5.32: Transfektionseffizienzen von Calciumphosphat/PAH/EGFP-DNA/PAH-Partikel, PAH/EGFP-DNA/PAH-Kapsel- und PAH/EGFP-DNA-Polyplexdispersion an HeLa-Zellen.

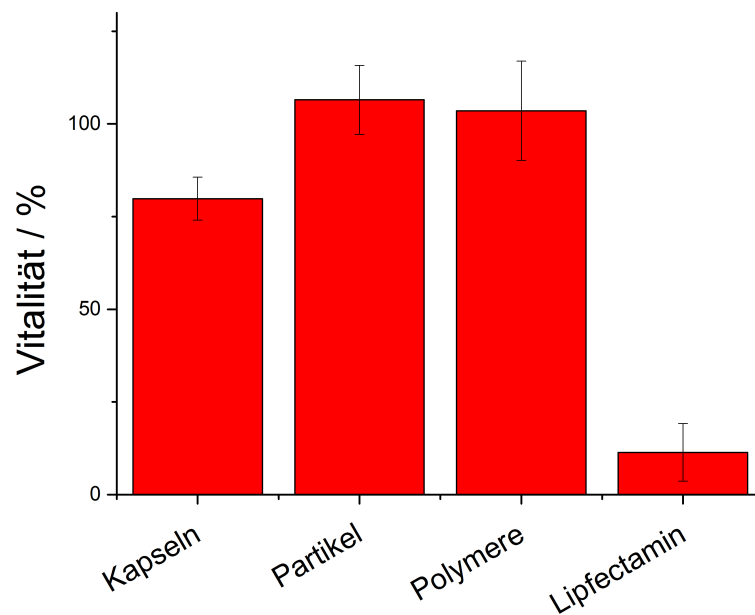


Abbildung 5.33: Mittels MTT-Test bestimmte Zellvitalität von HeLa-Zellen nach Transfektion mit Calciumphosphat/PAH/EGFP-DNA/PAH-Partikel, PAH/EGFP-DNA/PAH-Kapsel- und PAH/EGFP-DNA-Polyplexdispersion.

5.2.4 Zusammenfassung und Diskussion

Es konnten Calciumphosphat-Partikel durch eine Fällungsreaktion dargestellt werden. Diese wurden mit dem Polymer Polyallylamin stabilisiert. Die Partikel konnten mit Nukleinsäuren durch die *Layer-by-Layer* Technik funktionalisiert werden. Zum Schutz vor Nukleasen in der Zelle und zur besseren Aufnahme in die Zelle wurden die Partikel mit einer weiteren Schicht Polyallylamin funktionalisiert. Um einen Überschuss Polymer in der Dispersion durch nicht auf der Partikeloberfläche adsorbiertes Polymer zu vermeiden, wurden die für eine vollständige Umladung benötigten Mengen zugegeben. Die notwendigen Mengen wurden über Umladungsexperimente über Messung des ζ -Potentials ermittelt. Die gleichzeitige Messung der Größenverteilung mittels dynamischer Lichtstreuung ermöglichte die Kontrolle einer monodispersen, nanoskopischen Partikelgröße. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten eine einheitlich kugelförmige Morphologie. Der Calciumphosphat-Kern wurde durch Ansäuern und Dialyse der Dispersion herausgelöst. Das erfolgreiche Herauslösen konnte durch die Bestimmung der Probenzusammensetzung mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie und durch mechanische Eindrückversuche mittels Rasterkraftmikroskopie nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurden Polyplexe aus den verwendeten Nukleinsäuren und Polyallylaminhydrochlorid hergestellt.

Als Nukleinsäuren wurden eine Modell-DNA mit 50 Basenpaare, siRNA und EGFP-kodierende DNA verwendet. Die Größe der Partikel entspricht mit einem hydrodynamischen Durchmesser von etwa 150 nm der Größe, die für die durchgeführte Fällungsreaktion typisch ist.^[133]

Mit den hergestellten Systemen wurden Aufnahmeversuche in Zellen durchgeführt. Hierzu wurde in der äußeren Schicht der Partikel und Kapseln PAH, das mit Fluoresceinisothiocyanat markiert war, verwendet. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten eine gute Aufnahme von Partikeln und Polymerkapseln, wohingegen die Polyplexe zu einem sehr viel geringerem Maß aufgenommen wurden. Die Zellvitalität war für die drei Systeme vergleichbar.

Die Genstummschaltungseffizienz war vergleichsweise hoch. Auch hier war kein Unterschied zwischen Partikeln und Kapseln zu beobachten. Die Genstummschaltungseffizienz der Polyplexe war geringer.

In den Transfektionsversuchen zeigten die Partikel und Kapseln eine vergleichbare Transfektionseffizienz. Diese lag mit 10 % deutlich unter der von Lipofectamin. Auffallend war, dass die Partikel und Kapseln deutlich höhere Transfektionseffizienzen als die Polyplexe zeigten. Die Kapseln können als Grenzfall von Polyplexen angesehen werden, die jedoch

über den Schichtaufbau eine wohldefinierte Struktur haben.

In der Literatur werden Polymerkapseln sehr intensiv für die Wirkstofffreisetzung diskutiert. TRIPATHY *et al.* nutzten für die Darstellung von polymeren Hohlkapseln die Polymere Carboxymethylcellulose und Polyallylaminhydrochlorid. Es fanden mikroskopische Calciumcarbonatpartikel Anwendung als Templat. Diese wurden in einer Fällungsreaktion dargestellt und mit PAH stabilisiert.^[228] Anschließend erfolgten Umladungen durch Zugabe eines Überschusses an Polymeren. Die Reinigung erfolgte mittels Zentrifugation. Der Kern wurde durch Zugabe von EDTA herausgelöst. Als Modellwirkstoff für eine nachträgliche Beladung wurde BSA verwendet, das zu den Kapseln gegeben wurde. Durch Variation des pH-Wertes konnte eine gezielte Beladung der Partikel vorgenommen werden.

STREHLOW *et al.* verwendeten ebenfalls mikroskopische Calciumcarbonat Partikel als Templat für das Aufbringen von Polymerschichten.^[229]

Neben dem Transport von Proteinen finden sich Untersuchungen zur Verkapselung von Nukleinsäuren mit Polymerkapseln, die mittels *Layer-by-Layer* Technik aufgebaut wurden. Es finden sich viele Arbeiten, in denen mit PLGA Mikropartikeln gearbeitet wurde, in denen DNA eingekapselt war.^[230] Dieser Ansatz kann jedoch nach WANG *et al.* zu einigen Problemen führen. Ein Problem stellt die ineffiziente Verkapselung von hydrophiler DNA dar, des Weiteren kann der durch die freiwerdende Milchsäure lokal niedrige pH-Wert während der Degradation die DNA schädigen. In Kapseln kann der pH-Wert auf bis zu 1,5 fallen.^[231,232]

SANTOS *et al.* stellten ternäre Polyplexe aus DNA, Polyethylenimin und Hyaluronsäure her, die mit Calciumcarbonat verkapselt wurden. Diese Kapseln wurden mit Dextransulfat und Poly-L-Arginin ummantelt. Die Entfernung des überschüssigen Polymers erfolgte auch hier über Zentrifugation. Der Kern wurde durch den Zusatz von EDTA herausgelöst.^[233]

Der Einbau von Nukleinsäuren in Schichten über die *Layer-by-Layer* Technik bietet nach LI und ZHANG zahlreiche Vorteile gegenüber anderen Verkapselungstechniken.^[234] So wird meistens im wässrigen Milieu und nicht in organischen Lösungsmitteln gearbeitet.

Der kontrollierte schichtweise Aufbau ermöglicht den Einbau unterschiedlicher Plasmid-DNA in die einzelnen Schichten oder den Zusatz von *targeting*-Molekülen, wie zum Beispiel Antikörpern.

Durch die Wahl der Polymere kann die Nukleinsäure-Freisetzung gesteuert werden.

Da der Schichtaufbau nur durch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem kationischen Polymer erfolgt, werden die Nukleinsäuren keiner mechanischen Beanspruchung unterzogen, die ebenfalls zu einer Schädigung führen könnte.

SCHÜLER und CARUSO verwendeten Polystyrol- und Melaminformaldehyd-Partikel zum Aufbringen von Schichten aus DNA und kationischen Polyelektrolyten wie Polyethylen-

imin, Spermidin und Polyallylaminhydrochlorid. Es konnten 4 Doppelschichten aus DNA und Spermidin aufgebracht werden. Zum Aufbringen wurde ein Überschuss an Polymer zugegeben, und anschließend erfolgte eine Reinigung durch Zentrifugation.^[235] Es wurden jedoch keine Zelltests durchgeführt. Amin-funktionalisierte Siliciumdioxid-Partikel dienten ZELIKIN *et al.* als Templat zur Adsorption von Einzelstrang-, Doppelstrang- und Plasmid-DNA. Nach der DNA-Adsorption wurden eine Polykation-freie Verkapselung mit Thiolhaltigen Poly(methacrylsäure) und Poly(vinylpyrrolidon) durchgeführt. Der Durchmesser der SiO₂-Partikel lag zwischen 1 µm und 3 µm. Das Herauslösen des Kerns erfolgte mit Flußsäure.^[236]

Die Darstellung der Kapseln im Rahmen dieser Arbeit bietet einige Vorteile. Ein entscheidender Vorteil liegt in der sehr einfachen Entfernung des Calciumphosphat-Kerns mit verdünnter Salzsäure.

Die Darstellung von Mikro kapseln aus PAH und DNA findet sich bei VINOGRADOVA.^[225] Hier diente Melaminformaldehyd als Templat. Die Kapseln wurden mechanisch charakterisiert und mit Filmen auf planaren Oberflächen verglichen. Der Einbau von biologisch aktiver DNA und zellbiologische Untersuchungen fanden jedoch nicht statt.

Die durchgeführten Arbeiten zeigen, dass sich die Effizienzen von Kapseln und Partikeln im Rahmen der Fehlergrenzen nicht unterscheiden, jedoch über der von Polyplexen liegen. Die Zellaufnahmeversuche zeigen eine deutlich bessere Aufnahme der Partikel und Kapseln im Vergleich zu Polyplexen mit der gleichen Polymermenge. Ob dies auf unterschiedliche Aufnahmewege zurückzuführen ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Bei künftigen Arbeiten kann ein Augenmerk auf die Verwendung von nicht-toxischen Polykationen gelegt werden. Ein Beispiel für ein solches Polymer wäre Chitosan. Ein Nachteil dieses Polymers zur Stabilisierung von Calciumphosphat-Partikeln ist die schlechte Löslichkeit im alkalischen oder neutralen pH-Bereich. Ein möglicher Ansatz wäre es, stabilisierte Calciumphosphat-Partikel analog zu den hier gezeigten Arbeiten mit DNA zu beladen und anschließend mit Chitosan und DNA weitere Schichten aufzubauen. Ein eventuelles Auflösen des Calciumphosphatkerns sollte nach den hier gezeigten Ergebnissen die äußere Morphologie nicht ändern und eine gleiche biologische Wirkung haben.

Weiterhin kann versucht werden, durch nicht-kugelförmige Template eine entsprechende Hohlstruktur zu erhalten. Für diese könnte die Zellaufnahme mit der kugelförmigen verglichen werden. Von massiven Partikeln ist ein Unterschied zwischen Kugeln und Stäbchen aus der Literatur bekannt.^[237–239]

Weiterhin kann versucht werden, durch den Einbau von Substanzen, die die Transfektion erhöhen, bessere Wirkungen zu erzielen. Ein Beispiel wäre Chloroquin, das aus der Literatur für eine Erhöhung der Transfektionseffizienz bekannt ist.^[240–242]

6 Knochenersatz

6.1 Alendronat-haltige Paste

6.1.1 Einleitung

Natriumalendronat ist ein Bisphosphonat, bei dem die Reste R_1 und R_2 aus $-OH$ und $-(CH_2)_3NH_2$ bestehen (Tabelle 2.2, Abbildung 6.1). Alendronsäure findet Anwendung

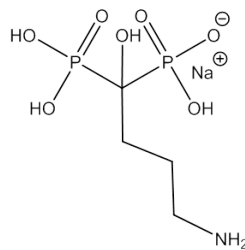


Abbildung 6.1: Formel von Natriumalendronat.

in der vorbeugenden Osteoporosebehandlung. So sind Medikamente wie zum Beispiel alendronasäure-biomo oder alendron-beta weit verbreitet. In der Literatur finden sich einige Arbeiten zu Alendronat-haltigem Knochenersatz.^[243] In Arbeiten von PANZAVOLTA wurde Alendronat mit einem Calciumphosphat-Zement gemischt, und es wurden *invitro*-Untersuchungen durchgeführt.^[244]

Eine eindeutige Aussage über einen positiven oder negativen Einfluss lässt sich nicht treffen. In vielen Studien zeigte sich eine schlechtere Frakturheilung durch die Zugabe von Natriumalendronat zum Knochenersatzmaterial. CANETTIERI *et al.* untersuchten die Defektheilung im Femur bei Ratten nach Auffüllen mit mikrogranulärem Hydroxylapatit und Natriumalendronat. Sowohl Natriumalendronat als auch die Mischung aus Alendronat und Calciumphosphat zeigten einen negativen Einfluss auf die Knochenheilung.^[245]

TANAKA untersuchte die Knochenneubildung im Kaninchen-Femur. Der Defekt wurde mit β -TCP und Natriumalendronat gefüllt.^[246] In diesen Arbeiten wurden poröse Tricalciumphosphatzylinder durch Sintern und anschließendes Schneiden hergestellt. Diese Formkörper wiesen eine hohe Porosität von 75 % auf und wurden in Natriumalendronat-Lösungen mit Konzentrationen zwischen $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ und $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ eingelegt. Es wurde eine schlechtere Knochenneubildung in Gegenwart von Alendronat beobachtet, die auf einen

verringerten Abbau des Knochenersatzes durch die gehemmte Osteoklastenaktivität zurückgeführt wurde.

Daneben gibt es Untersuchungen, in denen kein Unterschied zwischen Alendronat-haltigem und Alendronat-freiem Knochenersatz zu beobachten ist.^[243,247,248] MEGANCK untersuchte die Heilung von Knochendefekten in der Tibia von Mäusen nach 2, 3 und 5 Wochen. Das Alendronat wurde für die Versuche subkutan injiziert. Unterschiede in der Heilung zu den Kontrollgruppen, die kein Bisphosphonat erhielten, wurden nicht beobachtet.^[243] BODDE untersuchte den Einfluss von Alendronat-haltigem Knochenzement aus β -TCP auf die Heilung von Femur-Defekten beim Kaninchen. Es konnte kein positiver Effekt durch das Alendronat gezeigt werden.^[247]

Einzelne Autoren berichten jedoch über einen positiven Effekt auf die Knochenheilung durch Alendronat.^[249,250] TOKER untersuchte die Heilung von Defekten in der Calvaria bei Ratten. Es konnte eine signifikante höhere Osteoblastenzahl nach lokaler Gabe von Alendronat an den Defekten beobachtet werden.^[250] NISHITANI untersuchte die Heilung von Knochendefekten bei Kaninchen nach der subkutanen Gabe von Bisphosphonaten. Es wurde beobachtet, dass die Gabe von Alendronat in frühen Stadien der Heilung einen positiven Effekt hat.^[249]

Aufgrund der aus der Literatur unklaren Aussage über den Einfluss von Alendronsäurehaltigen Knochenersatz auf die Defektheilung ist eine solche Untersuchung von großem Interesse. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Formulierung auf der Basis von nanopartikulärem Calciumphosphat und Natriumalendronat gewählt. Im Gegensatz zu vielen in der Literatur beschriebenen Systemen war das Ziel die Darstellung einer injizierbaren Paste. Die Paste besteht aus der Calciumphosphat-Matrix und dem Natriumalendronat als Wirkstoff. Die Darstellung von nanoskopischem Calciumphosphat durch eine Fällungsreaktion und anschließender Polymerstabilisierung ist eine etablierte Technik.^[133,251]

Als stabilisierendes Polymer wurde Carboxymethylcellulose (CMC) gewählt. Die Stabilisierung von nanoskopischem Calciumphosphat mit CMC ist literaturbekannt.^[252,253] Carboxymethylcellulose ist ein anionisches Polymer. Die Struktur ist Abbildung 6.2 dargestellt. Die D-Glukoseeinheiten sind β -1 \rightarrow 4-glykosidisch verknüpft. CMC findet Verwendung als Verdickungs-, Stabilisierungs-, Dispergier-, Emulgier- oder Bindemittel. CMC bietet den Vorteil, dass es ein ungiftiges Polymer ist. Als Lebensmittelzusatzstoff ist es unter der Nummer E466 zugelassen.

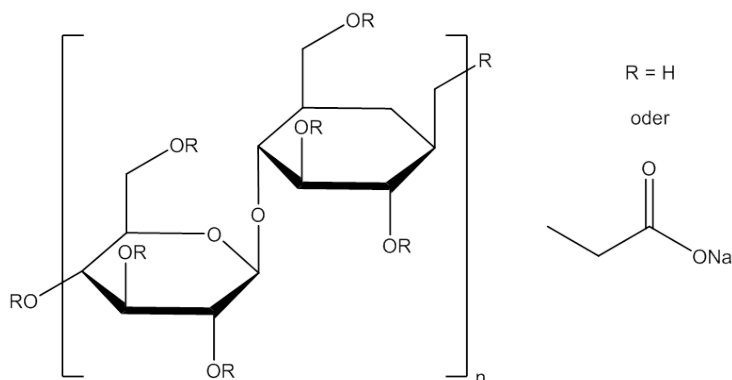


Abbildung 6.2: Struktur von Carboxymethylcellulose (Natriumsalz).

6.1.2 Darstellung von Carboxymethylcellulose-stabilisierten Calciumphosphatnanopartikeln

Zur Darstellung von CMC-stabilisierten Calciumphosphatpartikeln wurden eine wässrige Calcium-*L*-lactatpentahydrat-Lösung (MERCK, reinst) mit einer Konzentration von $5,54 \text{ g L}^{-1}$ und eine wässrige *di*-Ammoniumhydrogenphosphat-Lösung (Fluka, $\geq 99 \%$) mit einer Konzentration von $1,426 \text{ g L}^{-1}$ mit NH_3 -Lösung auf einen pH-Wert von 10 eingestellt.

Der pH-Wert einer wässrigen CMC-Lösung mit einer Massenkonzentration von 2 g L^{-1} (pH=6,95) wurde nicht eingestellt.

Die Fällung der Partikel erfolgte durch Zusammenpumpen der drei Lösungen über eine Peristaltikpumpe in ein 3-Liter Becherglas. Die Zutropfgeschwindigkeit der *di*-Ammoniumhydrogenphosphat-Lösung und der Calcium-*L*-lactatpentahydrat-Lösung betrug 15 mL min^{-1} , die Zutropfgeschwindigkeit der CMC-Lösung betrug 5 mL min^{-1} . Der schematische Aufbau ist in Abbildung 6.3 dargestellt. Nach dem Zusammenpumpen von insgesamt 1,6 L

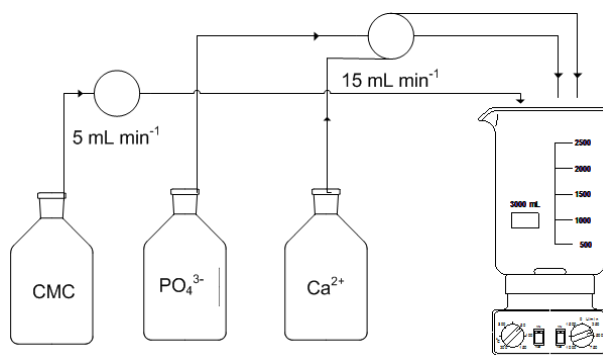


Abbildung 6.3: Schematischer Aufbau zur Fällung von Carboxymethylcellulose-stabilisierten Calciumphosphatnanopartikeln.

wurde die Dispersion in 32 Greinergefäße der Größe 50 mL umgefüllt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 5000 rpm (4700 g). Der Überstand wurde abgenommen, die Gefäße mit neuer Dispersion aufgefüllt und das in den Gefäßen gesammelte Zentrifugat mit der neuen Dispersion aufgeschlämmt. Nach 5 Zentrifugationsschritten wurde das aufgeschlämmte Zentrifugat bei einer Temperatur von 121 °C und einem Druck von 230 kPa für 20 Minuten autoklaviert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 5000 rpm (4700 g). Der Überstand wurde unter einer Sterilbank abgenommen und das Greiner-Gefäß zum Schutz vor mikrobiellen Kontaminationen mit *sealbreath*-Folie abgeklebt. Es folgte ein Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und eine anschließende Lyophilisation bei einer Temperatur von -7 °C und einem Druck von 0,310 mbar für 4 Tage. Die getrockneten Proben wurden bei -20 °C gelagert. Nach der Darstellung von 110 g Feststoff wurden alle Proben unter sterilen Bedingungen gemörsert und vereinigt. Für die tierexperimentellen Arbeiten wurden Aliquote von 2 g unter sterilen Bedingungen abgefüllt.

Zur Darstellung einer injizierbaren Paste wurden Gemische aus den lyophilisierten, CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Partikeln mit Reinstwasser hergestellt. Es wurde Wasseranteile von 50 %, 60 % und 70 % getestet. Die Pasten mit unterschiedlichen Wasseranteilen wurden in je eine Einwegspritze gefüllt. Anschließend wurde die Injizierbarkeit und Formstabilität der Gemische optisch bewertet.

Für die tierexperimentellen Arbeiten wurden Mischungen aus dem CMC-stabilisierten Calciumphosphat mit 55 % Reinstwasser bzw. 55 % einer wässrigen Natriumalendronatlösung mit einer Massenkonzentration von 2 g L⁻¹ unmittelbar vor der Applikation angerührt.

Zur Untersuchung eines Einflusses des Alendronates auf knochenbildende Zellen wurden wässrige Natriumalendronat-Lösungen zu MG-63-Zellen gegeben und nach unterschiedlichen Zeiten die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt. Des Weiteren wurden die lyophilisierten, CMC-stabilisierten Calciumphosphatpartikel in Reinstwasser bzw. einer Alendronatlösung ($c = 2 \text{ g L}^{-1}$) aufgeschlämmt und zu MG-63-Zellen gegeben. Die effektiven Konzentrationen lagen zwischen $6 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ und $6 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (Abschnitt 6.1.5).

6.1.3 Charakterisierung

Die CMC-stabilisierten Calciumphosphatnanopartikel wurden vor der Zentrifugation mittels dynamischer Lichtstreuung und Messung des ζ -Potentials charakterisiert. Die Intensitätsgewichtete und Anzahl-gewichtete Größenverteilung ist in Abbildung 6.4 dargestellt.

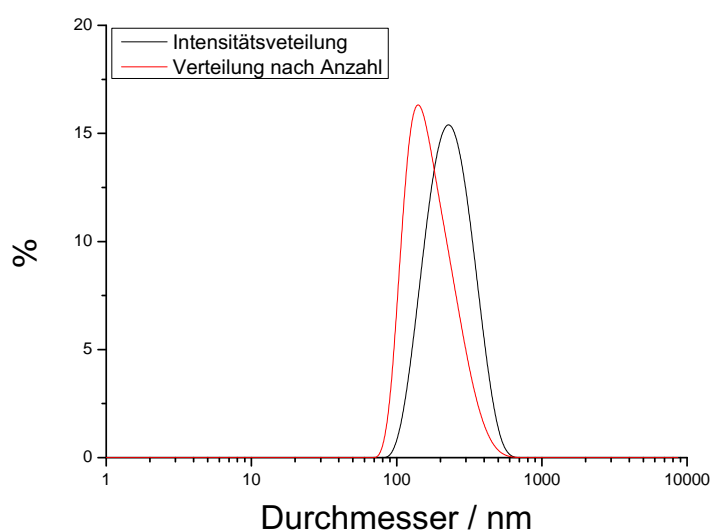


Abbildung 6.4: Anzahl- und Intensitätsgewichtete Größenverteilung der CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Das Maximum der Intensitätsgewichteten Größenverteilung liegt bei 220 nm. Mit einem PDI von 0,11 kann die Dispersion als monodispers angesehen werden.

Das ζ -Potential (Abbildung 6.5) lag bei -30 ± 5 mV. Zur Untersuchung der Nanopartikel mittels Rasterelektronenmikroskopie wurden etwa 20 μ L der Dispersion auf einen Siliciumträger getropft und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend erfolgte eine Bedampfung mit einer Gold-Palladium-Legierung (80 : 20) zur Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit. Eine repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahme ist in Abbildung 6.6 dargestellt.

Es sind kugelförmige nanoskopische Partikel zu erkennen. Durch Ausmessen von 20 zufällig gewählten Partikeln ergibt sich ein durchschnittlicher Durchmesser von 110 ± 30 nm. Die Partikelgrößenverteilung reicht von 80 nm bis 180 nm.

Das autoklavierte und lyophilisierte Produkt wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie, Röntgenpulverdiffraktometrie, Thermogravimetrie und Infrarotspektroskopie, Elementar-

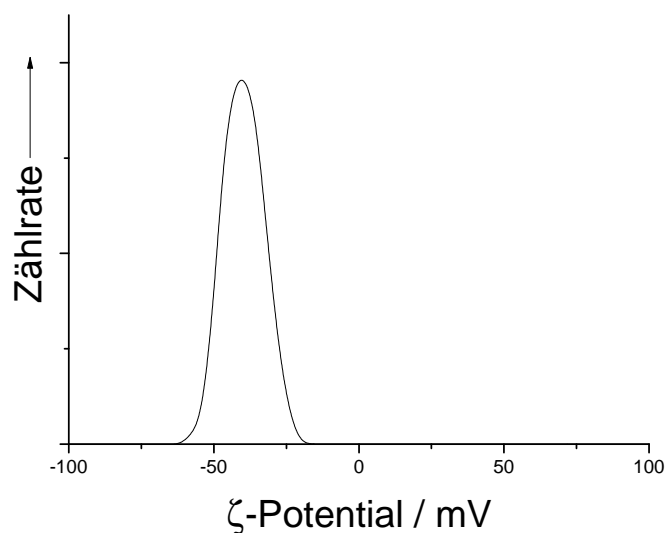


Abbildung 6.5: Zetapotential der Carboxymethylcellulose-stabilisierten Calciumphosphatnanopartikel.

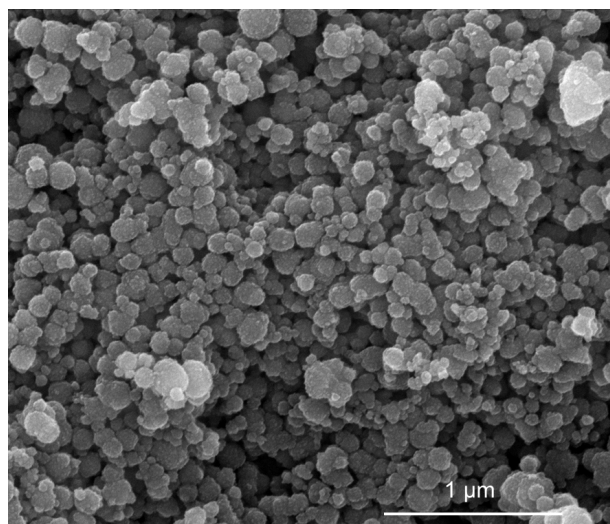


Abbildung 6.6: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Calciumphosphatnanopartikeln, die mit Carboxymethylcellulose stabilisiert wurden.

analyse sowie Messung der spezifischen Oberfläche durch Bestimmung einer BET-Isotherme charakterisiert. Es wurde eine spezifische Oberfläche von $112 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ermittelt.

Das mittels ATR-Infrarotspektroskopie aufgenommene Spektrum ist in Abbildung 6.7 dargestellt. Zum Vergleich wurden auch Spektren von reiner Carboxymethylcellulose und phasenreinem Hydroxylapatit aufgenommen. Im Spektrum sind die für Hydroxylapatit und Carboxymethylcellulose typischen Absorptionsbanden zu erkennen.

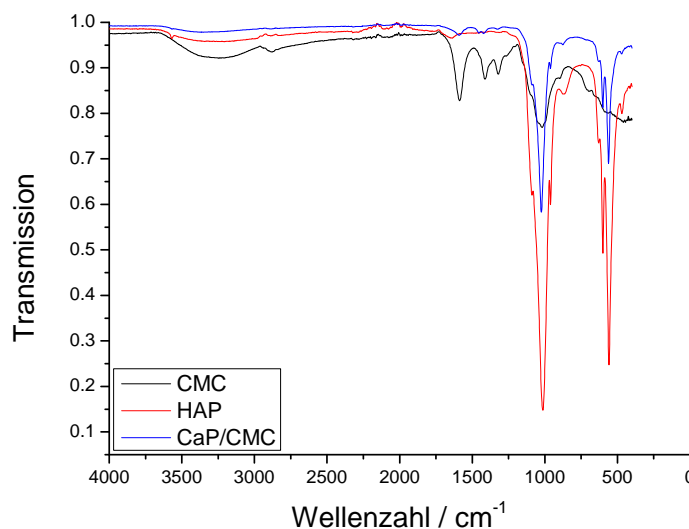


Abbildung 6.7: ATR-IR-Spektrum von CMC-stabilisiertem Calciumphosphat nach Lyophilisation (blau), Hydroxylapatit (rot) und Carboxymethylcellulose (schwarz).

In Abbildung 6.8 ist das Röntgenpulverdiffraktogramm der autoklavierten und lyophilisierten Probe dargestellt.

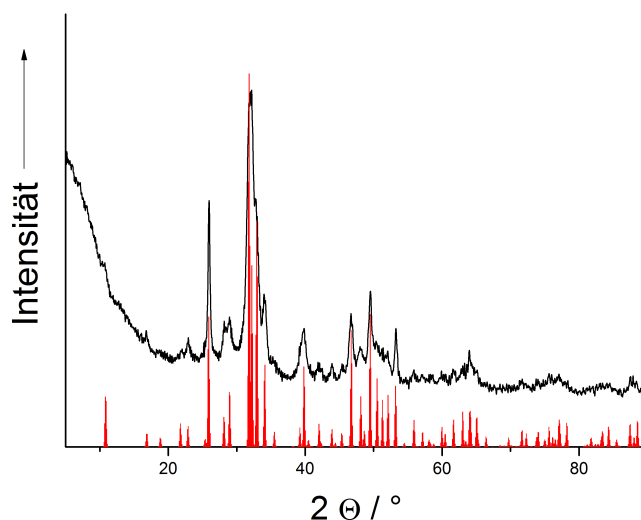


Abbildung 6.8: Röntgenpulverdiffraktogramm der autoklavierten und lyophilisierten Carboxymethylcellulose-stabilisierten Calciumphosphatnanopartikel (schwarz) und Literaturreflexe (ICDD-Datenbank 84-1998) (rot) von Hydroxylapatit.

Für die thermogravimetrische Untersuchung wurden 28,9 mg der autoklavierten und lyophilisierten Probe in einem Korundtiegel gegeben. Die Messung erfolgte unter einer Sauerstoffatmosphäre. Die Starttemperatur der Messung betrug 30 °C, die Endtemperatur 1000 °C. Die Heizrate lag bei 2 K min⁻¹.

Die Massenverluste in Abhängigkeit von der Temperatur sind in Abbildung 6.9 dargestellt. In Abbildung 6.9 sind Masseverluste in zwei Stufen zu erkennen. Im Temperaturbereich

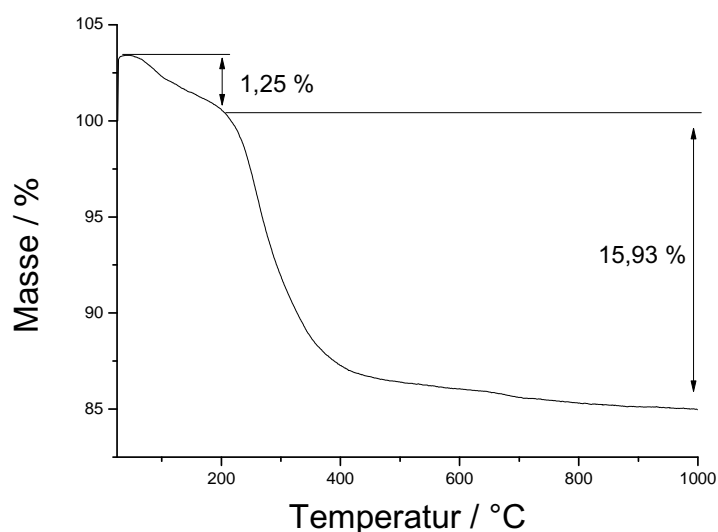


Abbildung 6.9: Thermogravimetrie der lyophilisierten CMC-stabilisierten Calciumphosphatpartikel.

von 30 °C bis etwa 150 °C kommt es zu einem Masseverlust von 1,25 %. Dieser Verlust wird durch das Verdampfen von enthaltender Restfeuchtigkeit verursacht. Die zweite, mit 15,9 % deutlich größere, Massenabnahme wird durch die Verbrennung der an den Partikeln enthaltenen Carboxymethylcellulose zu CO₂ hervorgerufen. Für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde die autoklavierte und lyophilisierte Probe auf einem Kohlenstoffträger geklebt und mit einer Gold-Palladium-Legierung (80 : 20) bedampft. In Abbildung 6.10 ist die elektronenmikroskopische Aufnahme dargestellt. Es sind nanoskopische Strukturen zu erkennen. Eine einheitlich kugelförmige Morphologie, wie bei den Partikeln (Abbildung 6.6) vor der Sterilisation mittels Dampf ist nicht zu erkennen.

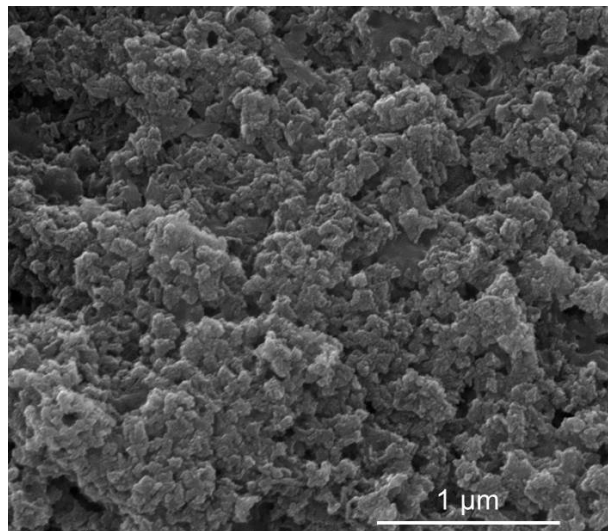


Abbildung 6.10: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von lyophilisierten autoklavierten Calciumphosphatpartikeln.

6.1.4 Darstellung einer injizierbaren Paste

Zur Darstellung einer injizierbaren Paste wurden 100 mg des autoklavierten und lyophilisierten Calciumphosphats mit 50 %, 60 % und 70 % Wasser vermischt. Die erhaltenen Gemische sind in Abbildung 6.11 abgebildet.

Es zeigte sich, dass Probe mit 50 % Wasser ein festes, grobkörniges Gemisch bildete, das sich nicht in eine Einwegspritze füllen ließ. Die Probe mit 60 % Wasser lieferte ein pastöses injizierbares Material mit einer hinreichenden Formstabilität, die Probe mit 70 % Wasser lag als nicht formstabiles niedrigviskoses Produkt vor (Abbildung 6.11).



Abbildung 6.11: CMC-stabilisierte Calciumphosphatnanopartikel mit unterschiedlichen Wassergehalten.

6.1.5 *In vitro*-Versuche

Alendronsäure wird in der Medizin zur vorbeugenden Behandlung von Osteoporose eingesetzt. Außerdem finden sich in der Literatur vereinzelt Hinweise auf einen positiven Effekt, den Alendronat auf das Wachstum von Osteoblasten besitzt.

Zum Nachweis eines positiven Effektes auf Osteoblasten wurden MG-63-Zellen mit wässriger Natriumalendronat-Lösung unterschiedlicher Konzentrationen versetzt. Hierzu wurden 100 μL der Alendronat-Lösung zu 50000 Zellen in 0,9 mL Zellmedium gegeben. Als Konzentrationen wurden $6 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $6 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ und $6 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ gewählt.

Die Proben wurden für 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden inkubiert.

Die Bestimmung der Vitalität erfolgte mittels des MTT-Tests. Die Vitalitäten sind in Abbildung 6.12 dargestellt. Die zellbiologischen Arbeiten wurden von Frau M.Sc. Rotan durchgeführt.

Es zeigte sich, dass Natriumalendronat in einer Konzentration von $6 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ zytotoxisch auf MG-63-Zellen wirkt. Bei niedrigeren Konzentrationen ist eine gegenüber den Kontrollproben ohne Alendronat-Zusatz erhöhte Zellvitalität zu erkennen. Bei einer

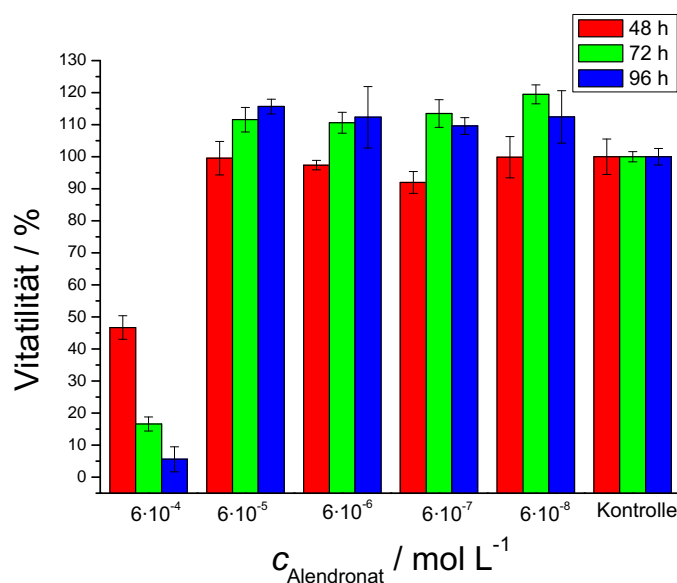


Abbildung 6.12: Mittels MTT-Test ermittelte Zellvitalitäten von MG-63-Zellen nach Inkubation mit Natriumalendronat unterschiedlicher Konzentrationen im Zellmedium.

48-stündigen Inkubation ist die Zellvitalität verglichen mit der 72- und 96-stündigen Inkubation signifikant verringert. Zwischen einer Inkubation von 72 Stunden und 96 Stunden ist kein signifikanter Unterschied für die Zellvitalität zu erkennen.

In der Literatur wird berichtet, dass Alendronsäure in hohen Konzentrationen zytotoxisch auf Osteoblasten wirkt. Nach SUN sind Alendronat-Konzentrationen größer $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ für MG-63-Zellen toxisch.^[254] ENJUANES zeigte, dass Alendronat für primäre Osteoblasten ebenfalls bei Konzentrationen unterhalb $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ nicht toxisch ist.^[255] XIONG *et al.*^[256] zeigten, dass die Zugabe von Natriumalendronat in geringen Konzentrationen zu einer erhöhten Zellvitalität, bezogen auf eine Kontrollprobe bei MG-63 Zellen, führt. Es wurden Konzentrationen zwischen $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ und $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ verwendet. Die Zeitpunkte, zu denen die Vitalität mittels MTT-Test bestimmt wurden, betrugen 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden. Die Versuchsparameter sind mit denen in der vorliegenden Arbeit gewählt sehr gut vergleichbar. XIONG beobachtete um etwa 15 % erhöhte Zellvitalitäten. der größte Effekt wurde nach 72 Stunden beobachtet.

Ein direkter Zusammenhang zwischen Inkubationsdauer und Zellvitalität konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Während es bei XIONG nach einer 96 stündigen Inkubation zu einem deutlichen Abfall der Zellvitalität, bezogen auf die Vitalität nach 72 stündiger Inkubation, kam, konnte ein solcher Abfall in den hier durchgeführten Experimenten nicht beobachtet werden.

Zur Abschätzung des Einflusses der Paste wurde CMC-stabilisiertes Calciumphosphat mit Alendronat gemischt. Hierfür wurden die Alendronatkonzentrationen $6 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ und $6 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ als effektive Konzentrationen im Zellmedium verwendet. Die zugehörigen Calciumphosphat-Konzentrationen lagen bei $1,5 \text{ g L}^{-1}$, 15 mg L^{-1} und $0,15 \text{ mg L}^{-1}$. Es wurden je $40 \text{ }\mu\text{L}$ der Dispersion zu $500 \text{ }\mu\text{L}$ Zellmedium mit 25000 MG-63-Zellen für die 48-stündige Inkubation und zu 5000 Zellen für die 96-stündige Inkubation gegeben. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Zellvitalität ermittelt. Die mittels MTT-Test ermittelten Zellvitalitäten sind in Abbildung 6.13 dargestellt. Im oberen Bild-

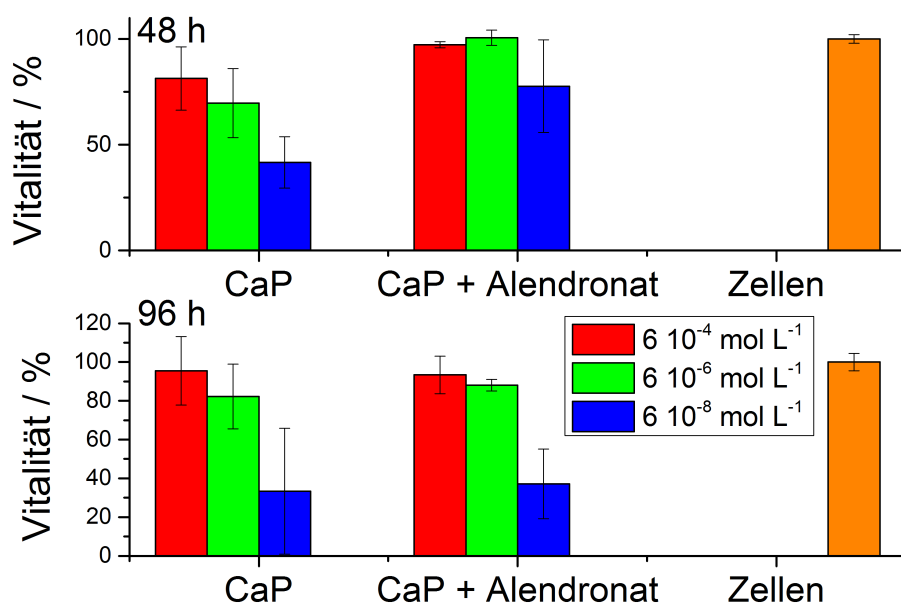


Abbildung 6.13: Zellvitalitäten von MG-63-Zellen nach Zugabe von Calciumphosphat und einer Mischung aus Calciumphosphat und Natriumalendronat-Lösung nach 48-stündiger (oben) und 96-stündiger (unten) Inkubation. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Natriumalendronatkonzentration im Zellmedium.

teil sind die Ergebnisse der 48-stündigen Inkubation, im unteren Bildteil die Ergebnisse der 96-stündigen Inkubation dargestellt. Ein positiver Effekt auf die Zellvitalität nach Zugabe der Paste ist nicht zu erkennen. In der hohen Konzentration wirken sowohl die Paste als auch das Calciumphosphat zytotoxisch. Dies ist auf die hohe Calciumkonzentration in den Probengefäßen zurückzuführen. In hohen Konzentrationen wirkt Calciumphosphat auf Zellen toxisch. In der mittleren und der niedrigen Konzentration ist keine verringerte Zellvitalität, verglichen mit der Kontrollprobe, zu erkennen. Es zeigt sich aber auch kein

Unterschied zwischen den Proben, die mit Calciumphosphat versetzt wurden, und den Proben, die mit einer Mischung aus Calciumphosphat und Alendronat versetzt wurden.

6.1.6 *in vivo*-Versuche

Die tierexperimentellen Arbeiten wurden am Universitätsklinikum Eppendorf in Hamburg an der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie (Direktor: Prof. Dr. med. Rueger) von Dr. med. Schlickewei und Dr. med. Laaff unter der Leitung von Prof. Dr. med. Lehmann durchgeführt. Diese wurden vom Amt für Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg unter der Nummer 113/11 genehmigt.

Ziel der Arbeiten war die vergleichende Untersuchung der Knochenheilung von Defekten, die mit einer injizierbaren Calciumphosphat-Paste bzw. einer alendronathaltigen Calciumphosphat-Paste gefüllt wurden.

Für die Versuche wurden weibliche Kaninchen der Rasse *New Zealand White* mit einem Gewicht von etwa 4 kg verwendet.

Diesen wurde mit einer Diamanthohlfräse ein Defekt mit einem Durchmesser von 83 mm und einer Länge von etwa 10 mm parallel zur Gelenkfläche in die Tibia gesetzt. Anschließend wurde der Defekt mit einer Paste aus den CMC-stabilisierten Calciumphosphaten und Wasser als Kontrollprobe bzw. aus CMC-stabilisiertem Calciumphosphaten mit Natriumalendronat-Lösung gefüllt. Der Flüssigkeitsanteil der Pasten betrug 55 %. Als weitere Kontrolle wurden Defekte in den Knochen gefräst, die nicht verfüllt wurden (Leerdeфекte). Es wurde die Knochenheilung nach 2, 4 und 12 Wochen untersucht. Für jede Defektgruppe wurden je 4 Tiere verwendet.

In Abbildung 6.14 sind photographische Aufnahmen von einem Defekt (A) und einem mit der Paste verfüllten Defekt (B) gezeigt. In Abbildung C ist die Röntgenaufnahme eines Leerdefektes aus der Kontrollgruppe abgebildet, in Abbildung D ist die Röntgenaufnahme eines verfüllten Defekts dargestellt. Man erkennt sehr gut, dass sich der Defekt mit der Paste gut verfüllen lässt. Nach Ablauf der Standzeiten wurde der Knochen entnommen. Der Knochen wurden geschnitten, und es wurden von Kossa und Toluidinblau-Färbung von den Schnitten angefertigt. Anschließend wurden Kenngrößen wie das Verhältnis von Knochenvolumen zu Gewebenvolumen, Trabekel-Anzahl, der Abstand zwischen den Knochenbalken, und Osteoidvolumen im Verhältnis zum Knochenvolumen und zum Gewebenvolumen bestimmt.

In Abbildung 6.15 ist das Verhältnis von Knochenvolumen zu Gewebenvolumen nach unterschiedlichen Zeiten dargestellt. Es zeigt sich eine Zunahme des Knochenvolumens mit der Zeit. Nach 12 Wochen ist die stärkste Knochenneubildung in den mit Paste verfüllten

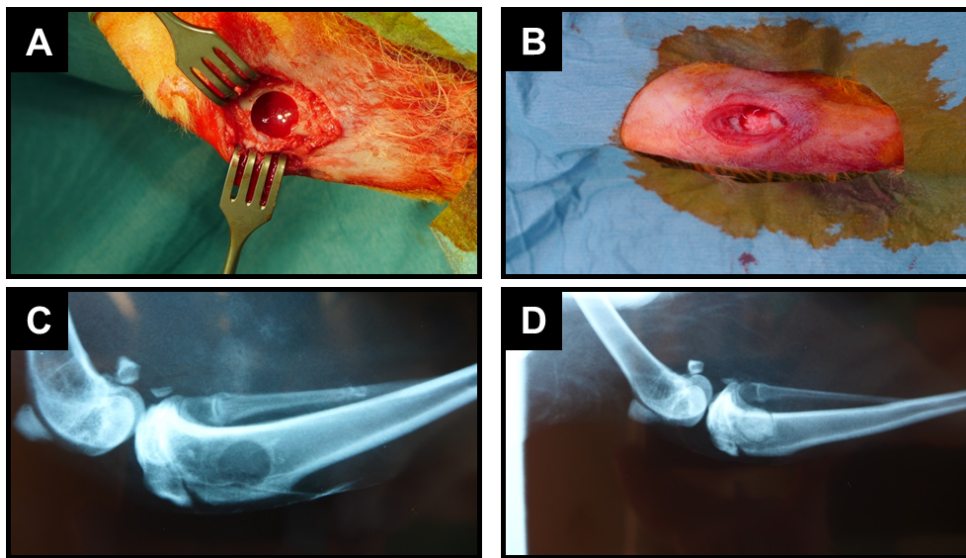


Abbildung 6.14: Leerdefekt (A), mit Calciumphosphat-Paste gefüllter Defekt (B), Röntgenaufnahme des Leerdefekts (C) und Röntgenaufnahme des mit Calciumphosphat-Paste gefüllten Defekts (D)

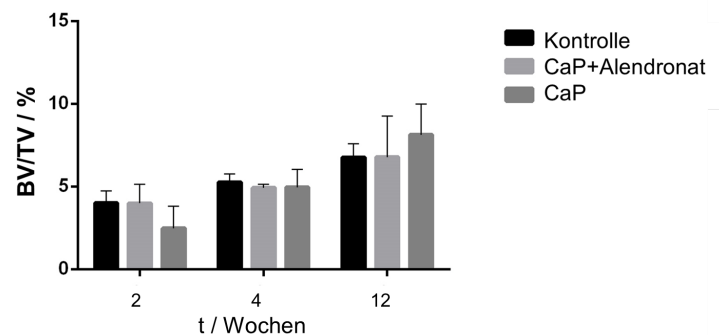


Abbildung 6.15: Verhältnis von Knochen- zu Gewebenvolumen für die mit Calciumphosphat und Calciumphosphat mit Alendronat gefüllten Defekte sowie für die Kontrollprobe (Leerdefekt) nach unterschiedlichen Zeiten.

Defekten zu beobachten. Die Trabekelzahlen der Proben sind in Abbildung 6.16 gezeigt. Ein Unterschied in den einzelnen Proben bei unterschiedlichen Standzeiten ist nicht zu erkennen. Die Kontrollproben zeigen eine geringere Trabekelzahl als die Defekte, die mit Calciumphosphat-Paste oder Alendronat-haltiger Paste gefüllt wurden. In Abbildung 6.17 sind die Trabekelabstände für die unterschiedlichen Proben dargestellt. In der Kontrollprobe (Leerdefekt) ist der Abstand nicht signifikant größer als in den Defekten, die mit Calciumphosphat gefüllt wurden. Für die Leerdefekte, die nicht verfüllt wurden ist der Abstand der Trabekel nicht signifikant höher als für die verfüllten Defekte. Dieser Befund deckt sich mit der Bestimmung der Trabekelzahl (Abbildung 6.16), die für die nicht mit

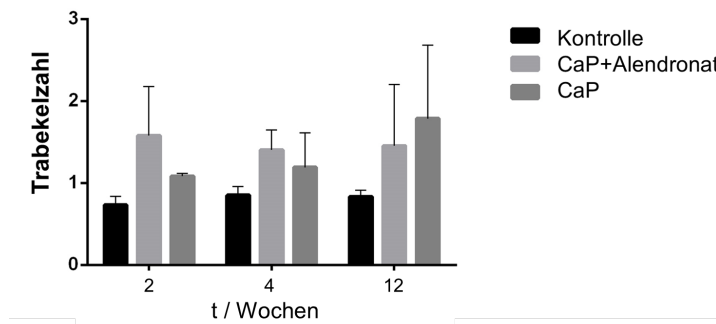


Abbildung 6.16: Trabekelzahl für die mit Calciumphosphat und Calciumphosphat mit Alendronat gefüllten Defekte sowie für die Kontrollprobe (Leerdefekt) nach unterschiedlichen Zeiten.

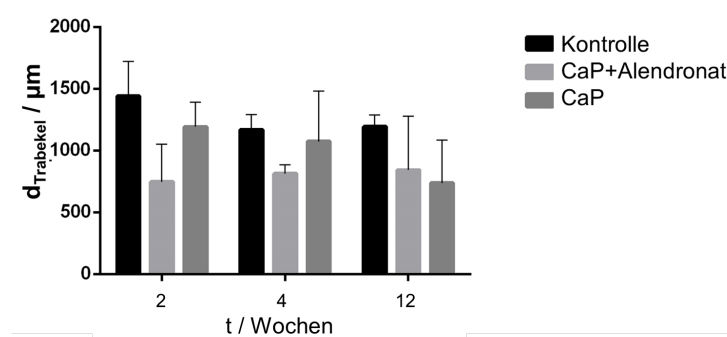


Abbildung 6.17: Trabekelabstand für die mit Calciumphosphat und Calciumphosphat mit Alendronat gefüllten Defekte sowie für die Kontrollprobe (Leerdefekt) nach unterschiedlichen Zeiten.

Calciumphosphat gefüllten Proben niedriger war für die mit einer Paste gefüllten Defekte. Abbildung 6.18 zeigt das Verhältnis von Osteoidvolumen zu Knochenvolumen für die unterschiedliche gefüllten Defekte nach unterschiedlichen Zeiten. Auffällig ist der Wert nach einer Standzeit von zwei Wochen für die mit Alendronathaltiger Paste gefüllten Defekte.

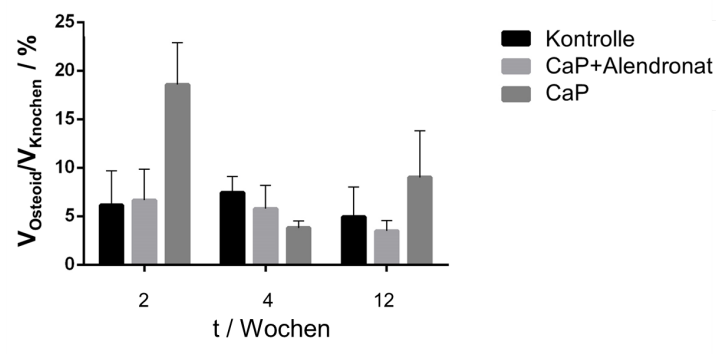


Abbildung 6.18: Verhältnis von Osteoidvolumen zu Knochenvolumen für die mit Calciumphosphat und Calciumphosphat mit Alendronat gefüllten Defekte sowie für die Kontrollprobe (Leerdefekt) nach unterschiedlichen Zeiten.

6.1.7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Calciumphosphatnanopartikel dargestellt werden, die mit Carboxymethylcellulose stabilisiert wurden. Die Partikel wiesen einen Durchmesser von etwa 100 - 200 nm auf. Durch Lyophilisation konnte ein Pulver mit einer spezifischen Oberfläche von $112 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ dargestellt werden.

Das Pulver konnte sowohl mit Wasser als auch mit einer wässrigen Natriumalendronat-Lösung zu einer Paste aufgeschlämmt werden. Die erhaltene Paste ließ sich über eine Spritze injizieren und wies eine ausreichende Formstabilität für den klinischen Einsatz auf. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Formulierung lässt sich gut zum Auffüllen von knöchernen Defekten nutzen.

Die Zugabe von Natriumalendronat zu der Paste, die zu einer direkten Applikation des Wirkstoffs im Defekt führt, zeigte weder einen positiven noch einen negativen Effekt auf die Knochenheilung. Dieser Befund deckt sich mit den Arbeiten von CANETTIERI *et al.*, bei denen kein Unterschied in der Frakturheilung von Defekten in der Tibia von Ratten nach Verfüllung des Defektes mit Calciumphosphat bzw. einer Mischung aus Calciumphosphat und Alendronat zu beobachten war.^[245] Ein Unterschied zu den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Arbeiten liegt in der Verwendung von mikrogranulärem Calciumphosphat statt einer injizierbaren Paste.

6.2 Transfizierende Paste

6.2.1 Einleitung

Die Anforderungen an ein biologisches oder synthetisches Knochenersatzmaterial sind hoch. Das Material, das eingesetzt wird, darf nicht toxisch oder kanzerogen sein. Außerdem sollte es keine Immunantwort auslösen. Das Material sollte biologisch abbaubar sein. Die Abbaugeschwindigkeit sollte sich nicht wesentlich von der Geschwindigkeit des Knochenwachstums unterscheiden. Wird das Material zu schnell abgebaut, so besteht die Möglichkeit, dass Narbengewebe eingebaut wird. Ein zu langsamer Abbau des Ersatzes kann zu einem Einwachsen führen.

In diesem Kapitel wird die Darstellung einer transfizierenden Paste als Knochenersatzmaterial ausgehend von KLESING^[131] und CHERNOUSOVA^[257] gezeigt.

Von CHERNOUSOVA *et al.* wurde ein Mehrkomponenten-Ansatz gewählt. Es wurde eine Matrix aus Calciumphosphat-Nanopartikeln, die mit Carboxymethylcellulose stabilisiert wurden, verwendet.

Als biologisch aktive Komponente wurden Ostim-Stäbchen eingesetzt. Diese wurden mit Polyethylenimin elektrosterisch stabilisiert. Anschließend erfolgte das Aufbringen von BMP-7- und VEGF-A-kodierender DNA. Es folgte das Aufbringen einer äußeren Schicht Polyethylenimin. Durch die Verwendung dieser 3-schaligen Partikel wird die DNA vor Nukleasen geschützt. Des Weiteren werden kationische Partikel von Zellen besser aufgenommen als anionische, da diese mit der negativ geladenen Phospholipid-Doppelschicht der Zellen besser wechselwirken.

Ein möglicher Nachteil bei der Verwendung von CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln als Matrix für die biologisch aktive Komponente besteht darin, dass es zu einer Wechselwirkung der positiv-geladenen biologisch aktiven Partikel mit den negativ geladenen Partikeln der Matrix kommen kann. Daher bestand ein Ziel dieser Arbeit darin, ein geeignetes kationisches oder neutrales Polymer zu finden, um die Calciumphosphat-Partikel der Matrix zu stabilisieren. Das Polymer muss einige Anforderungen erfüllen. Es darf nicht toxisch sein und sollte nach Möglichkeit eine Zulassung als Medizinprodukt oder Nahrungsmittelzusatzstoff haben. Des Weiteren muss es die Partikel, die die Matrix bilden, ausreichend stabilisieren. Die biologisch aktive Komponente wird in die Matrix eingearbeitet. Je besser die Partikel vor Agglomeration geschützt sind, desto homogener lassen sich die Komponenten vermischen.

Beim *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) handelt es sich um ein Signalmolekül, das die Vaskularisierung unterstützt.^[258,259] Unter der Vaskularisierung wird die Gefäß-

neubildung verstanden.

6.2.2 Darstellung der Matrix

Als mögliche Polymere zur Stabilisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln wurden Polyvinylpyrrolidon (PVP) und Poly- ϵ -Lysin gewählt (PLL). Polyvinylpyrrolidon ist ein ungeladenes Polymer. Die Lewis-Formel der Monomereinheit ist in Abbildung 6.19 dargestellt. PVP wird in der Kosmetik und der Pharmazie vielfältig eingesetzt.^[260] PVP wird u.a. in Desinfektionsmitteln eingesetzt, da es Iod komplexieren kann,^[261,262] oder als Blutplasmaersatzstoff verwendet.^[263] Als Lebensmittelzusatzstoff ist PVP unter E1201 in der für Lebensmittel ohne eine spezifische numerische Höchstmenge zugelassen.^[14] Es

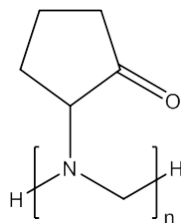


Abbildung 6.19: Struktur der Monomereinheit des Polymers Polyvinylpyrrolidon.

ist aus der Literatur zur Stabilisierung von metallischen Nanopartikeln, wie zum Beispiel Gold und Silber bekannt.^[264–266] Zur Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanostäbchen im Rahmen dieser Arbeit wurden 60 mg Ostim in 1 mL Reinstwasser dispergiert, mit 2 mL einer PVP-Lösung mit einer Massenkonzentration von 2 g L^{-1} versetzt, mit Reinstwasser auf 10 mL verdünnt und anschließend mittels Ultraschalldisperser 1 Minute dispergiert. Die Charakterisierung erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung und Messung des ζ -Potentials. Zur Abtrennung des nicht-adsorbierten Polymers wurde die Dispersion 30 Minuten bei 4700 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt. Das Redispersieren in Reinstwasser erfolgte mittels Ultraschalldisperser.

Ferner wurde versucht, die Calciumphosphate mit Chitosan zu stabilisieren. Bei Chitosan handelt es sich um das Deacetylierungsprodukt von Chitin.

Als weiteres Polymer wurde Poly- ϵ -Lysin getestet. Die Lewis-Formel der Monomereinheit ist in Abbildung 4.32 abgebildet. Bei Poly- ϵ -Lysin handelt es sich um das Homopolymer der essentiellen Aminosäure Lysin. Die Lysineinheiten sind über das ϵ -ständige Amin am Rest mit der α -ständigen Carboxylgruppe der nächsten Aminosäure verknüpft. Typischerweise beträgt die Kettenlänge 25–35 Aminosäureeinheiten.^[267] PLL wird durch Bakterien der Art *Streptomyces albulus* erzeugt.^[138,268]

6.2.3 Ergebnisse und Diskussion

Die Stabilisierung von Ostim mit Polyvinylpyrrolidon gelang nicht. Es wurde ein instabiles System, in dem es zur Flockung kam, beobachtet. Die mittels dynamischer Lichtstreuung ermittelten Größenverteilungen sind in Abbildung 6.20 dargestellt. Der Durchmesser liegt

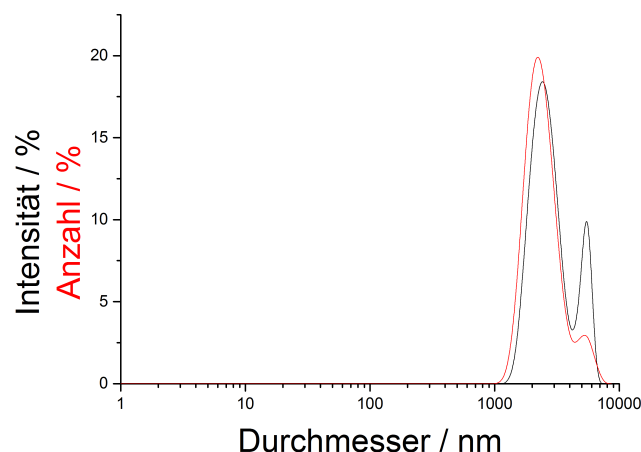


Abbildung 6.20: Intensitäts- (schwarz) und Anzahl- (rot) gewichtete Größenverteilung von Ostim nach Zugabe von Polyvinylpyrrolidon und Behandlung mittels Ultraschalldispenser.

deutlich über $1\ \mu\text{m}$. Die Partikel ließen sich nach Zentrifugation nicht redispergieren. Eine längere Behandlung der Dispersion mittels Ultraschalldispenser von 5 Minuten vor der Zentrifugation führte zu keiner Stabilisierung. Eine möglicher Ursache liegt in der fehlenden elektrostatischen Stabilisierung der Partikel. Da PVP ein neutrales Polymer ist, kann nur eine sterische Stabilisierung erfolgen. Die Messung des ζ -Potentials verdeutlicht die fehlende elektrostatische Stabilisierung. Das ζ -Potential lag bei $4 \pm 4\ \text{mV}$ (Abbildung 6.21). Es gelang nicht, die Partikel erfolgreich mit Polyvinylpyrrolidon zu beschichten und eine ausreichende Stabilität der Partikel zu erhalten. URCH *et al.* konnten dagegen Calciumphosphatnanopartikel mit Polyvinylpyrrolidon erfolgreich beschichten.^[269]

Die Partikel, die mit einer Chitosanlösung versetzt wurden und mittels Ultraschalldispenser behandelt wurden, zeigten keine monodisperse Größenverteilung. Der Polydispersitätsindex lag bei 0,43. Die Größenverteilungen, die mittels dynamischer Lichtstreuung ermittelt wurden, sind in Abbildung 6.22 abgebildet. In der Intensitäts-gewichteten Größenverteilung sieht man deutlich eine Aggregatbildung. Nach Zentrifugation bei $4700\ \text{g}$ für 30 Minuten war ein Redispergieren in Reinstwasser nicht möglich. Weitere Variationen, wie zum Beispiel ein Redispergieren in einem pH-gepuffertem Medium, wurden nicht

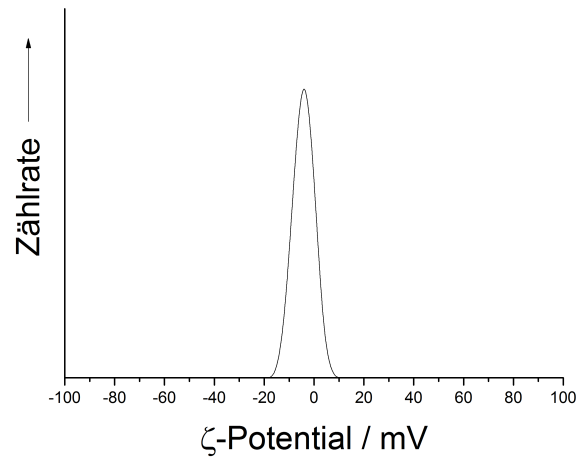


Abbildung 6.21: Zetapotential von Ostim nach Zugabe von Polyvinylpyrrolidon und Behandlung mittels Ultraschalldisperser.

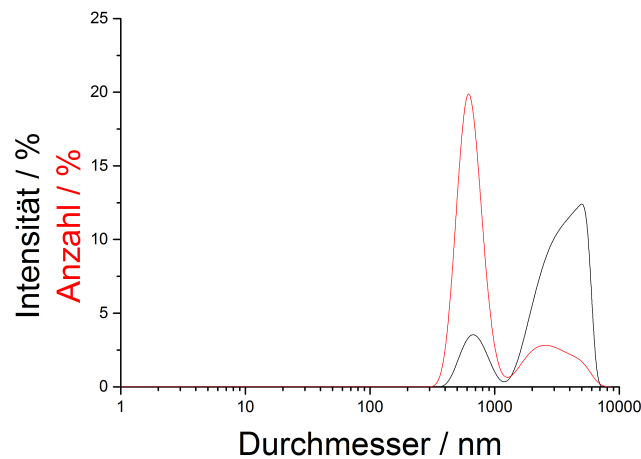


Abbildung 6.22: Mittels dynamischer Lichtstreuung ermittelte Größenverteilung von Ostim nach Zugabe von Chitosan und Behandlung mittels Ultraschalldisperser.

durchgeführt.

Die Stabilisierung von Ostim mit Poly- ϵ -Lysin wird im Abschnitt 4.1.12 genau diskutiert. Zur Darstellung einer ausreichenden Menge für eine biomedizinische Anwendung wurde versucht, mit deutlich höheren Konzentrationen zu arbeiten. In Abbildung 6.23 sind die mittels dynamischer Lichtstreuung ermittelten Größenverteilungen von Calciumphosphat, das in unterschiedlichen Verhältnissen mit Polylysin stabilisiert wurde, dargestellt. Alle Dispersionen waren mit Polydispersitätsindices zwischen 0,21 und 0,25 monodispers. In

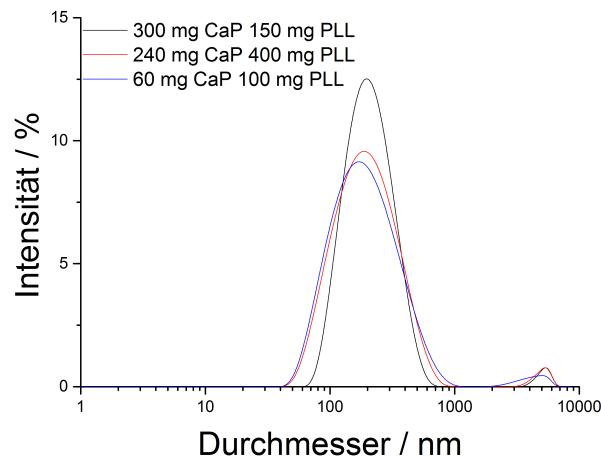


Abbildung 6.23: Intensitätsgewichtete Größenverteilung von Ostim nach Stabilisierung mit unterschiedlichen Mengen Polylysin.

den Intensitäts-gewichteten Größenverteilungen ist kein Unterschied der einzelnen Dispersionen zu erkennen. In den Anzahl-gewichteten Größenverteilungen ist die Dispersion, bei der 300 mg Calciumphosphat mit 150 mg Polymer stabilisiert wurde, mit 90 nm größer, als die anderen Dispersionen, bei denen das Maximum bei 70 nm lag (Abbildung 6.24). Hierbei ist zu beachten, dass mit der dynamischen Lichtstreuung eine Intensitäts-gewichtete Größenverteilung ermittelt wird und die Anzahl-gewichtete Größenverteilung berechnet wird, so dass es zu Ungenauigkeiten kommen kann. Die untersuchten Dispersionen wiesen ζ -

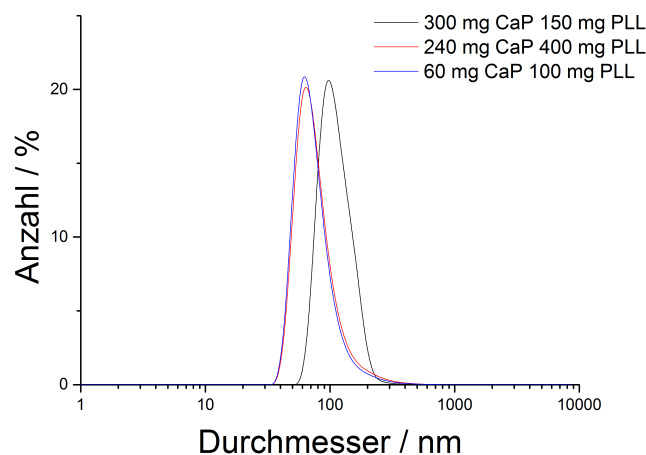


Abbildung 6.24: Mit dynamischer Lichtstreuung ermittelte Anzahl-gewichtete Größenverteilung von Ostim nach Stabilisierung mit unterschiedlichen Mengen Polylysin

Potentiale über +30 mV auf. Die Dispersion aus 300 mg Calciumphosphat und 150 mg Polymer in einem Volumen von 20 mL hatte mit 49 ± 5 mV das höchste ζ -Potential.

Nach Zentrifugation und anschließender Trocknung im Trockenschrank wurde der Polymergehalt mittels Thermogravimetrie ermittelt.

Die Dispersion wurde nach Zentrifugation mittels Gefriertrocknung bei -10°C und einem Druck von 0,310 mbar sowie im Trockenschrank bei einer Temperatur von 50°C getrocknet. Zur Charakterisierung wurden die Proben mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Zwei repräsentative Aufnahmen sind in Abbildung 6.25 dargestellt. Die im

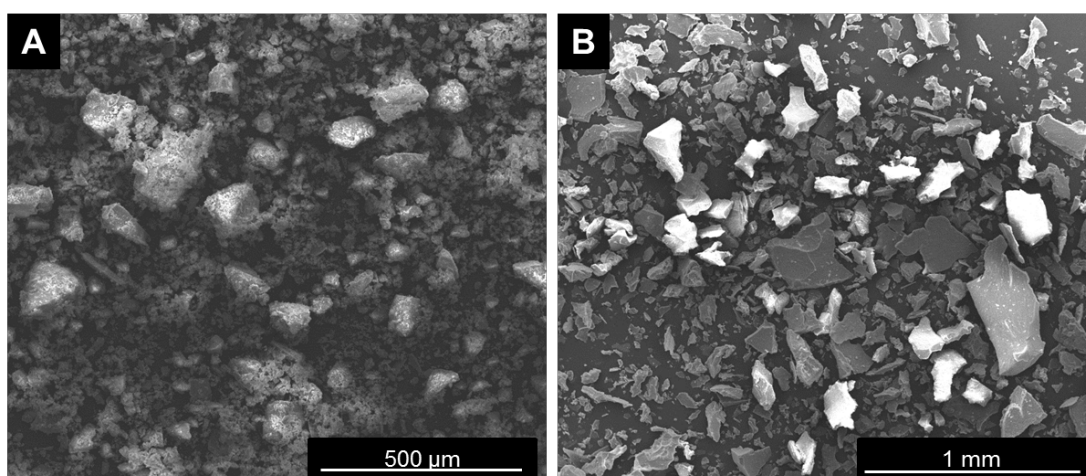


Abbildung 6.25: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Poly- ϵ -Lysin-stabilisiertem Ostim nach Trocknung mittels Lyophilisation (A) und Trockenschrank (B).

Trockenschrank getrocknete Probe wirkt etwas grobkörniger als die durch Lyophilisation getrocknete Probe. Ein direkter Unterschied ist jedoch nicht zu erkennen.

Zur Bestimmung der spezifischen Oberfläche beider Proben wurden BET-Messungen angefertigt. Die durch Gefriertrocknung getrocknete Probe hatte eine spezifische Oberfläche von $72\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$, bei der thermisch getrockneten Probe betrug die spezifische Oberfläche $62\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$. Die Messung der spezifischen Oberfläche von lyophilisiertem Ostim ohne adsorbiertes Polymer lieferte einen Wert von $77\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$.

Die theoretisch zu erwartende Oberfläche lässt sich unter der Annahme einer gleichmäßig großen zylindrischen Form der Partikel mit einer Länge von 175 nm und einem Durchmesser von 20 nm abschätzen. Ein solcher Zylinder hat ein Volumen von $5,4977 \cdot 10^{-23}\text{ m}^3$ (Gleichung 4.8). Die Oberfläche des Zylinders beträgt $1,16 \cdot 10^{-14}\text{ m}^2$ (Gleichung 4.11).

Bei einer Dichte von $3,16 \text{ g cm}^{-3}$ hat ein Stäbchen eine Masse von

$$\begin{aligned} m &= \rho \cdot V = 3160 \text{ kg m}^{-3} \cdot 5,4977 \cdot 10^{-23} \text{ m}^3 \\ &= 1,74 \cdot 10^{-19} \text{ kg}. \end{aligned} \quad (6.1)$$

Ein Gramm besteht somit aus

$$\frac{1 \cdot 10^{-3} \text{ kg}}{1,74 \cdot 10^{-19} \text{ kg}} = 5,76 \cdot 10^{15} \quad (6.2)$$

Calciumphosphatstäbchen. Dies entspricht einer theoretischen Gesamtfläche von

$$5,76 \cdot 10^{15} \text{ g}^{-1} \cdot 1,162 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2 \approx 67 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1} \quad (6.3)$$

In der Literatur wird die spezifische Oberfläche von Ostim mit $102 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ angegeben.^[124] Die theoretisch berechnete Oberfläche stimmt sehr gut mit der gemessenen überein. Sie weicht jedoch stark von der in der Literatur angegebenen spezifischen Oberfläche für Ostim ab. In der Literatur wird keine Aussage getroffen, ob es sich bei dem angegebenen Wert um einen abgeschätzten oder experimentell bestimmten Wert handelt. Die durchgeführten BET-Messungen zeigten, dass die lyophilisierte Probe eine höhere spezifische Oberfläche als die im Trockenschrank getrocknete Probe aufwies.

Zum Nachweis einer antibakteriellen Wirkung wurden *E.coli* Bakterien in Gegenwart von ungereinigter Ostimdispersion, dem in der Dispersion enthaltenen Polylysin und zwei Kontrollproben auf Agarplatten ausgesät. Die biologischen Arbeiten wurden von Frau M.Sc. Chernousova durchgeführt. Die Photographien der Proben nach Inkubation bei 37°C sind in Abbildung 6.26 dargestellt. Man erkennt sehr gut den Hemmhof in der mit Antibiotikum versetzten Probe, dieser ist erwartungsgemäß in der Negativkontrolle nicht zu erkennen. Für die mit Polylysin-Lösung und ungereinigten Partikeln inkubierte Probe sind keine Unterschiede in der Hemmhofausbildung zu erkennen. Mittels Thermogravimetrie wurde der Polymergehalt der gereinigten Partikel bestimmt. Anschließend wurden eine Ostimdispersion ohne Polymer-Stabilisierung, eine Ostimdispersion mit Polylysin-Stabilisierung sowie eine Polylysinlösung mit gleicher Polymerkonzentration angesetzt. Es folgte die Zugabe von *E.coli* zu den Flüssigkeiten und ein Ausstreichen auf Agar-Platten. Die Proben wurden für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die photographischen Aufnahmen sind in Abbildung 6.27 gezeigt. Hier zeigt sich bei den beiden Calciumphosphat-Proben keine Hemmhof-Ausbildung. In der Probe, die mit verdünnter Polylysin-Lösung inkubiert wurde, ist ein sehr dünner Hemmhof zu erkennen. In diesen Versuchen konnte ein antibakterieller

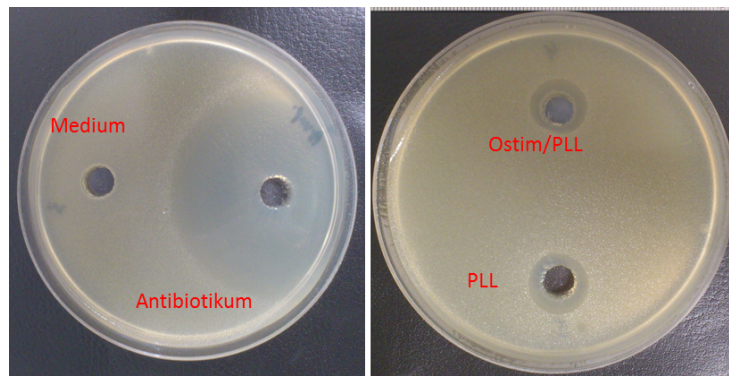


Abbildung 6.26: Photographische Aufnahmen von Agarplatten mit *E. coli* nach Inkubation bei 37 °C für 24 Stunden (links), in Gegenwart von Antibiotikum (links), in Gegenwart von ungereinigter Ostimdispersion mit Poly- ϵ -Lysin und der entsprechenden Polymermenge in Wasser (rechts).

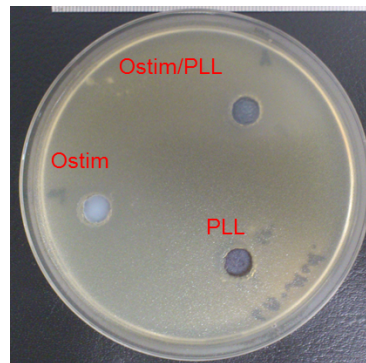


Abbildung 6.27: Photographische Aufnahmen von Agarplatten mit *E. coli* nach Inkubation bei 37 °C für 24 Stunden in Gegenwart von Polylysin-stabilisiertem gereinigtem Ostim, unfunktionalisiertem Ostim und Polylysinlösung.

Effekt für Polylysin gezeigt werden. Die gereinigten Partikel weisen einen solchen nicht auf. Mögliche Ursache hierfür ist neben der geringen Konzentration die gute Adsorption des Polymers an der Calciumphosphatoberfläche. Diese bewirkt, dass das Polylysin nicht in den Agar diffundieren kann. Daher ist dieser Test nur bedingt zur Untersuchung eines antibakteriellen Effektes für die Matrix des Knochenersatzmaterials geeignet.

Aufgrund der guten Stabilisierbarkeit von Calciumphosphat-Stäbchen mit Poly- ϵ -Lysin und dem antibakteriellen Effekt des freien Polymers wird dieses für die Darstellung des Knochenersatzmaterials verwendet. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Ungiftigkeit und Zulassung als Nahrungsmittelkonservierungsstoff.

6.2.4 Darstellung der transfizierenden Komponente

Zur Darstellung der transfizierenden Komponente wurde versucht, Poly- ϵ -Lysin stabilisiertes Ostim als Träger für DNA zu verwenden und dieses mit einer weiteren Schicht Poly- ϵ -Lysin umzuladen. In Kapitel 4.1.12 wurde bereits die geringe DNA-Adsorptionskapazität für PLL-stabilisiertes Ostim gezeigt. In Kapitel 4.1.13 wurde erwähnt, dass die mit DNA dotierten Partikel keine Transfektion zeigten. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz von 3-schaligen Partikeln wurde PLL-stabilisiertes Ostim mit DNA vollständig umgeladen. Anschließend wurde eine äußere Schicht Polylysin aufgebracht, um kationische Partikel zu erhalten. Die biologischen Arbeiten wurden von Frau M. Sc. Chernousova durchgeführt. In Abbildung 6.28 sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen (B,E), die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (A,D) und die Überlagerungen (C,F) dargestellt. Es zeigt sich deutlich, dass die PEI-haltigen Partikel eine deutlich höhere Transfektionseffizienz haben. Die Abbildungen G-H zeigen die Kontrollprobe mit Lipofectamin. Die mittels MTT-Test

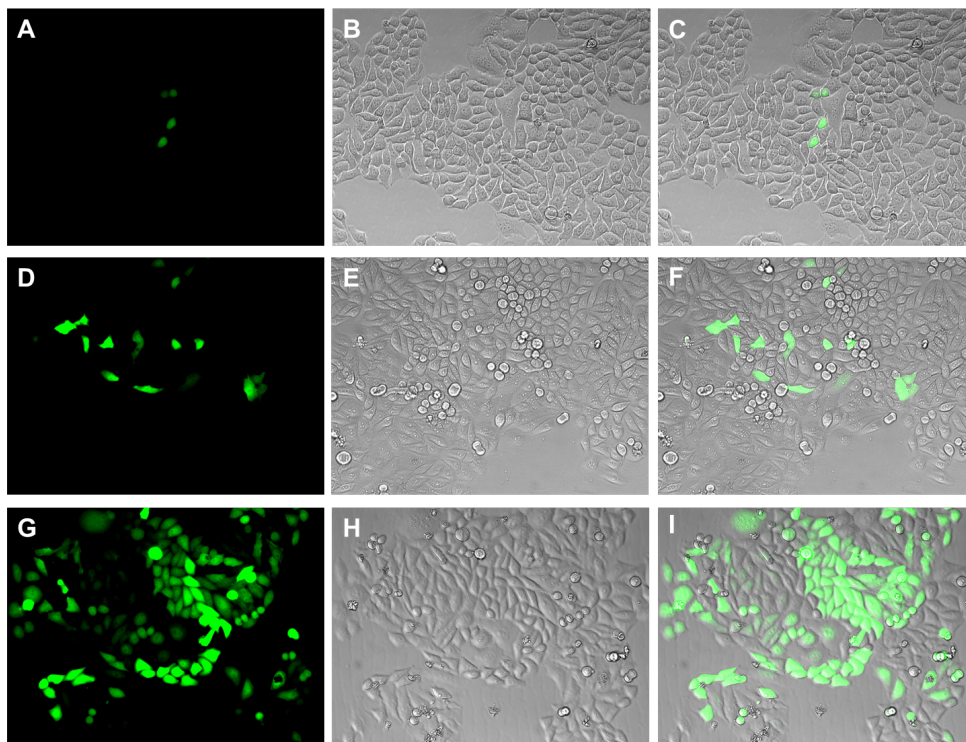


Abbildung 6.28: HeLa-Zellen nach Transfektion mit CaP/PLL/DNA/PLL (oben) und CaP/PEI/DNA/PEI. Links sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, mittig die lichtmikroskopischen Aufnahmen und rechts die Überlagerungen aus Licht- und fluoreszenzmikroskopie dargestellt.

bestimmten Zellvitalitäten sind in Abbildung 6.29 dargestellt. Im Rahmen der Fehler ist kein Unterschied in der Zellvitalität für die HeLa-Zellen, die mit Ostim-PEI-DNA-PEI

Partikeln und mit Ostim-PLL-DNA-PLL Partikeln inkubiert wurden, zu sehen. Für die PEI-haltigen Partikel lag die Vitalität bei $92 \pm 4\%$, für die Poly- ϵ -Lysin-haltigen Partikel bei $100 \pm 7\%$

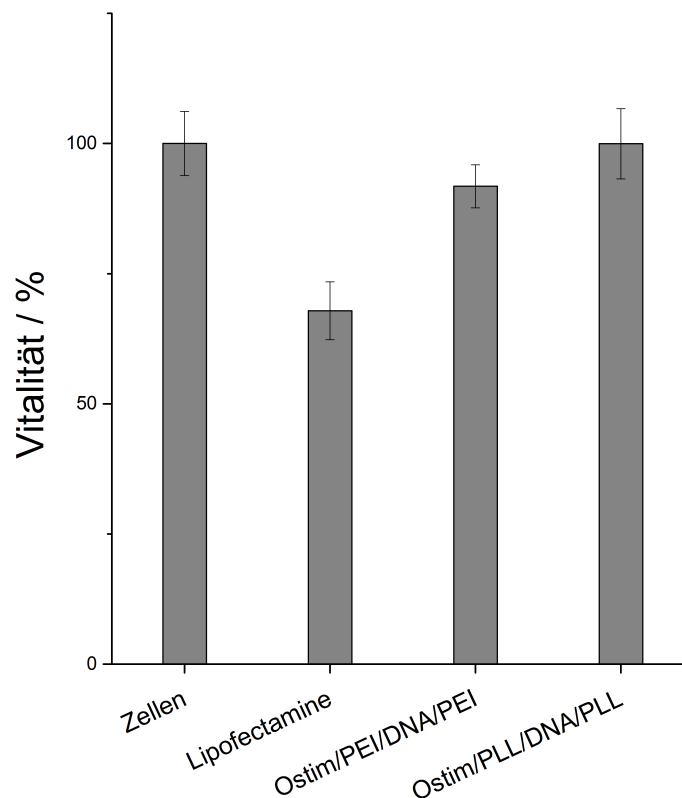


Abbildung 6.29: Vitalität von HeLa-Zellen nach Transfektion mit Ostim-Partikeln, die mit zwei Schichten Polylysine bzw. Polyethylenimin und einer Schicht DNA beschichtet wurden.

In Abbildung 6.30 sind die mikroskopischen Aufnahmen der Transfektionsversuche an MG-63-Zellen dargestellt. Bei den Ostimpartikeln, die mit zwei Schichten Poly- ϵ -Lysin beschichtet wurden, waren keine Zellen zu erkennen, die EGFP exprimierten. Daher ist nur eine lichtmikroskopische Aufnahme abgebildet. Die Calciumphosphate, die statt des PLL mit verzweigtem Polyethylenimin funktionalisiert wurden, zeigten auch für die MG-63-Zellen eine erfolgreiche Transfektion. Die mit Lipofectamin durchgeführte Positiv-Kontrolle zeigt eine zu den Ostim/PEI/DNA/PEI vergleichbare Transfektionseffizienz.

Wie bei den Inkubationen von HeLa-Zellen wurde auch bei den Transfektionsversuchen an MG-63-Zellen die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.31 dargestellt. Die Zellvitalität nach Inkubation mit Ostim, das mit zwei Schichten

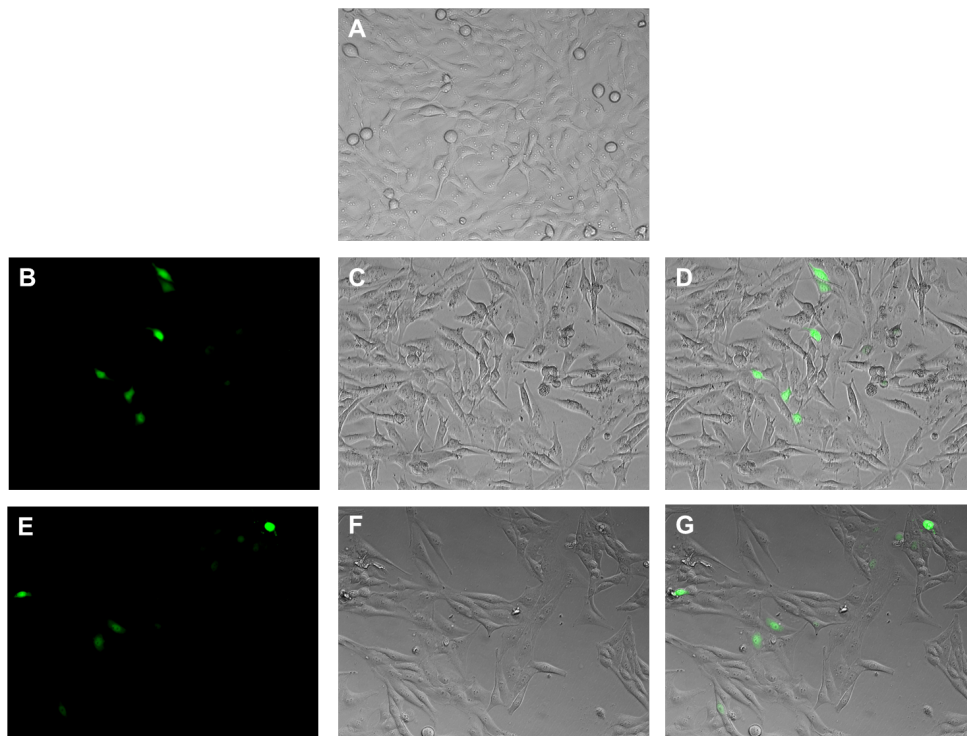


Abbildung 6.30: MG-63-Zellen nach Inkubation mit CaP/PLL/DNA/PLL (oben), CaP/PEI/DNA/PEI (mitte) und Lipofectamine/DNA (unten). Links sind die Fluoreszenzaufnahmen, in der Mitte die lichtmikroskopischen Aufnahmen und rechts die überlagerten Bilder dargestellt.

verzweigtem Polyethylenimin und einer Schicht DNA ummantelt wurde, lag bei $58 \pm 16 \%$ und ist damit vergleichbar für die Kontrolle mit Lipofectamin, bei der die Vitalität bei $55 \pm 14 \%$ lag. Für die Zellen, die mit Ostim, das mit zwei Schichten Poly- ϵ -Lysin und einer mittleren Schicht DNA funktionalisiert wurden, lag die Vitalität bei $105 \pm 2 \%$. Die Stabilisierung der Ostim-Partikel und anschließende Umladung ist mit beiden Poylelektrolyten möglich. Die mit Poly- ϵ -Lysin funktionalisierten Partikel zeigen keine Zytotoxizität. Sie zeigen jedoch keine Transfektionseffizienz im Gegensatz zu dem Polyethylenimin-haltigen System. Dieses weist eine deutlich eingeschränkte Zellvitalität auf. Diese Einschränkung ist für das Material hinzunehmen, um eine Expression der gewünschten Proteine zu erhalten.

6.2.5 Zusammenfassung und Ausblick

Ausgehend von KLESING *et al.*^[131] und CHERNOUSOVA *et al.*^[257] wurde eine Formulierung für eine injizierbare Paste auf Basis von Calciumphosphat entwickelt, die durch ihre transfizierenden Eigenschaften die Knochenheilung verbessern soll. Um eine Aussage über die Wirksamkeit treffen zu können, sind tierexperimentelle Arbeiten notwendig. Die tierexpe-

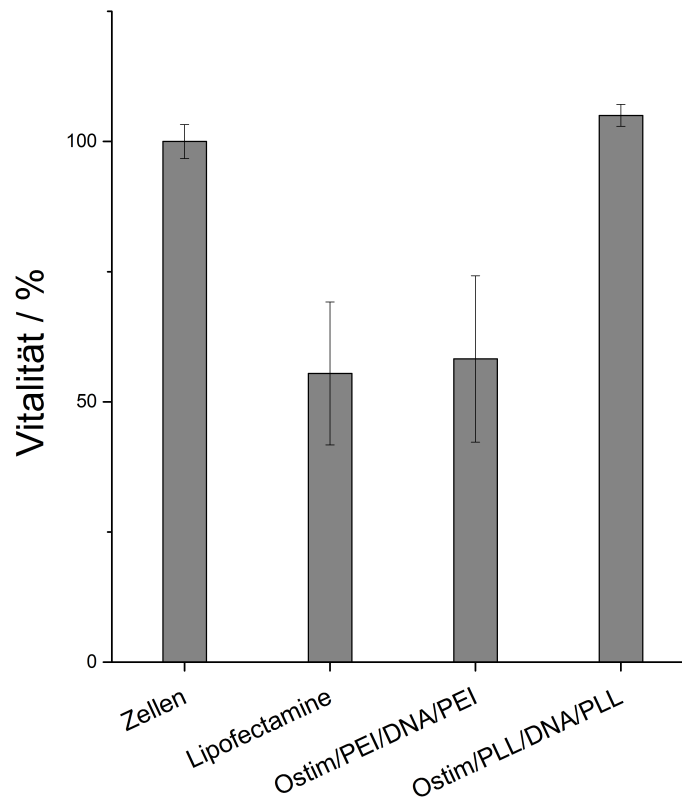


Abbildung 6.31: Vitalität von MG-63-Zellen nach Transfektion mit Ostim-Partikeln, die mit zwei Schichten Polylysin bzw. Polyethylenimin und einer Schicht DNA beschichtet wurden nach 48 Stunden.

rimentellen Arbeiten wurden vom Amt für Verbraucherschutz der Freie und Hansestadt Hamburg unter der Nummer 65/13 genehmigt.

Für die Arbeiten wurden analog zu der in Kapitel 6.1.6 beschriebenen Art Runddefekte in die Tibia von Kaninchen gesetzt und mit der Paste verfüllt. Die Durchführung dieser Arbeiten erfolgt im Jahr 2014 am Universitätsklinikum Eppendorf in Hamburg unter der Leitung von Prof. Dr. med. Lehmann und Dr. med. Schlickewei und Dr. med. Laaff aus der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie (Direktor: Prof. Dr. med. Rueger).

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Ostim-Nanostäbchen erfolgreich mit unterschiedlichen kationischen Polymeren stabilisiert und kolloidchemisch untersucht. Ferner wurde der auf den Partikeln adsorbierte Polymergehalt bestimmt. Es wurde lineares Polyethylenimin mit zwei unterschiedlichen Kettenlängen, verzweigtes Polyethylenimin, Polyallylaminhydrochlorid mit zwei unterschiedlichen molaren Massen, Polydiallyldimethylammoniumchlorid sowie α - und ϵ -verknüpftes Polylysine verwendet. Für alle Systeme wurde die Menge an DNA bestimmt, die auf die Partikel aufgebracht werden kann, ohne eine Umladung zu erreichen. Es folgten Untersuchungen zur Transfektionseffizienz der Systeme. Mit allen verwendeten Polymeren konnten Ostim-Stäbchen erfolgreich stabilisiert werden. Bei den zellbiologischen Untersuchungen zeigten die mit verzweigtem Polyethylenimin stabilisierten und DNA-dotierten Partikel die höchste Transfektionseffizienz.

Weiterhin gelang es, die mit Polymeren stabilisierten Partikel mit einer Siliciumdioxid-Schicht zu umhüllen. Auf diese Schicht konnte nach Silanisierung mit APTES Fluorescein-isothiocyanat als Modellmolekül aufgebracht werden. Die gelang sowohl für die Stabilisierung mit einem anionischen als auch mit einem kationischen Polyelektrolyten.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit ein aus der Literatur bekanntes System aus Calciumphosphat, Polyethylenimin und DNA zur Transfektion genauer charakterisiert. Hierbei gab es Hinweise auf das Vorhandensein von Polyplexen. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden Calciumphosphat-Partikel dargestellt, die mit mehreren Schichten Polymeren umhüllt wurden. Durch das Herauslösen des festen Calciumphosphatkerns wurden hohle Strukturen (Kapseln) erzeugt, die als geordnete Polyplexe angesehen werden können. Die Partikel und Kapseln wurden elektronenmikroskopisch und mittels dynamischer Lichtstreuung charakterisiert. Ein Nachweis der hohlen Morphologie der Kapseln konnte durch Eindrückversuche mittels Rasterkraftmikroskopie geführt werden. In zellbiologische Untersuchungen zeigte sich kein Unterschied zwischen den Partikeln mit Kern und den Kapseln ohne Kern hinsichtlich ihrer Transfektions- oder Genstummschaltungseffizienz.

Im letzten Teil der Arbeit wurden zwei pastöse Formulierungen auf Basis von Calciumphosphat-Nanomaterialien zur möglichen Behandlung von Knochenfrakturen entwickelt. Die erste Paste enthielt den aus der Osteoporose-Behandlung bekannten Wirkstoff Natriumalendronat. Die Calciumphosphate für diese Paste wurden durch eine Fällungsreaktion aus

Calciumlactat und di-Ammoniumhydrogenphosphat dargestellt. Durch die Stabilisierung der Partikel mit dem anionischen Polymer Carboxymethylcellulose konnte das Partikelwachstum gestoppt werden. Eine Neuerung des Materials im Vergleich zu Versuchen aus der Literatur liegt in der Injizierbarkeit der Paste. Die in Kooperation durchgeführten *in vivo*-Experimenten zeigten keinen Unterschied in der Knochenheilung durch Einbringen des Wirkstoffs in die Paste.

Die zweite Formulierung besteht aus einer Paste, in der DNA-haltige Calciumphosphat-Nanopartikel sind. Diese sollen nach Applikation in den Defekt Zellen transfizieren und so die Proteinexpression von Wachstumsfaktoren bewirken, um eine bessere Frakturheilung zu erzielen. Diese Formulierung steht vor einer *in vivo* Testung.

Literaturverzeichnis

- [1] H. D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme: Physik und Chemie*, Springer, **2002**.
- [2] G. Lagaly, *Colloids*, Wiley-VCH, **2000**.
- [3] H. Goesmann, C. Feldmann, *Angew. Chem.*, **2010**, 122, 1402.
- [4] G. C. Bond, *Gold Nanopart. Phys., Chem. Biol.*, Imperial College Press, S. 171–197.
- [5] DIN SPEC 1121: Nanotechnologien - Terminologie und Begriffe für Nanoobjekte - Nanopartikel, Nanofaser und Nanoplättchen.
- [6] Verordnung (EG) Nr.1223/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 30. November 2009 über kosmetische Mittel (Text von Bedeutung für den EWR).
- [7] Empfehlung der Kommission vom 18. Oktober 2011 zur Definition von Nanomaterialien (Empfehlung 2011/696/EU).
- [8] D. H. Everett, *Grundzüge der Kolloidwissenschaft*, Steinkopff, **1992**.
- [9] J. Koetz, S. Kosmella, *Polyelectrolytes and Nanoparticles*, Springer, **2007**.
- [10] G. Lagaly, O. Schulz, R. Zimehl, *Dispersionen und Emulsionen*, Steinkopff, **1997**.
- [11] *Kirk-Othmer, Chemical Technology of Cosmetics*, Wiley, **2012**.
- [12] M. Epple, *Biomaterialien und Biomineralisation*, B. G. Teubner Verlag, Wiesbaden, **2003**.
- [13] E. Riedel, *Anorganische Chemie*, Walter de Gruyter, **2004**.
- [14] Zusatzstoff-Zulassungsverordnung vom 29. Januar 1998 (BGBl. I S. 230, 231), die zuletzt durch Artikel 3 der Verordnung vom 21. Mai 2012 (BGBl. I S. 1201) geändert worden ist.
- [15] S. V. Dorozhkin, *J. Funct. Biomater.*, **2010**, 1, 22.

- [16] D. P. Clark, N. Pazdernik, A. Held, *Molekulare Biotechnologie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, **2009**.
- [17] D. Gancberg, C. Kessler, A. Hoeveler, R. Draghia-Akli, *Mol. Ther.*, **2012**, *20*, 2191.
- [18] N. Miller, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2012**, *11*, 419.
- [19] T. Wirth, N. Parker, S. Yla-Herttuala, *Gene*, **2013**, *525*, 162.
- [20] S. Ylae-Herttuala, *Mol. Ther.*, **2012**, *20*, 1831.
- [21] T. Kim, J. Eberwine, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, *397*, 3173.
- [22] J. A. Wolff, R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani, P. L. Felgner, *Science*, **1990**, *247*, 1465.
- [23] E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, P. H. Hofschneider, *EMBO J.*, **1982**, *1*, 841.
- [24] N. Odani, K. Ito, H. Nakamura, *Dev. Growth. Differ.*, **2008**, *50*, 443.
- [25] J. C. Sanford, T. M. Klein, E. D. Wolf, N. Allen, *Part. Sci. Technol.*, **1987**, *5*, 27.
- [26] B. Darbani, S. Farajnia, M. Toorchi, S. Zakerbostanabad, S. Noeparvar, C. N. Stewart Jr., *Biotechnology*, **2011**, *10*, 323.
- [27] N. S. Yang, J. Burkholder, B. Roberts, B. Martinell, D. McCabe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, *87*, 9568.
- [28] D. Fischer, T. Bieber, Y. Li, H.-P. Elsasser, T. Kissel, *Pharm. Res.*, **1999**, *16*, 1273.
- [29] F. P. Seib, A. T. Jones, R. Duncan, *J. Controlled Release*, **2007**, *117*, 291.
- [30] E. Kleemann, N. Jekel, L. A. Dailey, S. Roesler, L. Fink, N. Weissmann, R. Schermuly, T. Gessler, T. Schmehl, C. J. Roberts, W. Seeger, T. Kissel, *J. Drug Target.*, **2009**, *17*, 638.
- [31] R. Deng, Y. Yue, F. Jin, Y. Chen, H.-F. Kung, M. C. M. Lin, C. Wu, *J. Controlled Release*, **2009**, *140*, 40.
- [32] M. Matar, G. Slobodkin, A. Rea-Ramsey, E. Brunhoeber, J. L. Skoyen, J. G. Fewell, D. H. Lewis, K. Anwer, *J. Biomed. Nanotechnol.*, **2006**, *2*, 53.
- [33] H. Lv, S. Zhang, B. Wang, S. Cui, J. Yan, *J. Controlled Release*, **2006**, *114*, 100.

- [34] Y. Wu, W. Wang, Y. Chen, K. Huang, X. Shuai, Q. Chen, X. Li, G. Lian, *Int. J. Nanomedicine*, **2010**, 5, 129.
- [35] M. Bauer, B. W. Kristensen, M. Meyer, T. Gasser, H. R. Widmer, J. Zimmer, M. Ueffing, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **2006**, 98, 395.
- [36] B. Dalby, S. Cates, A. Harris, E. C. Ohki, M. L. Tilkins, P. J. Price, V. C. Ciccarone, *Methods*, **2004**, 33, 95.
- [37] C. Kneuer, M. Sameti, U. Bakowsky, T. Schiestel, H. Schirra, H. Schmidt, C.-M. Lehr, *Bioconjug. Chem.*, **2000**, 11, 926.
- [38] K. K. Sandhu, C. M. McIntosh, J. M. Simard, S. W. Smith, V. M. Rotello, *Bioconjug. Chem.*, **2001**, 13, 3.
- [39] M. C. Duran, S. Willenbrock, A. Barchanski, J.-M. Muller, A. Maiolini, J. Soller, S. Barcikowski, I. Nolte, K. Feige, H. Murua Escobar, *J. Nanobiotechnology*, **2011**, 9, 47.
- [40] S. Miyoshi, J. Flexman, D. Cross, K. Maravilla, Y. Kim, Y. Anzai, J. Oshima, S. Minoshima, *Mol. Imaging Biol.*, **2005**, 7, 286.
- [41] A. Kovtun, R. Heumann, M. Eppler, *Biomed. Mater. Eng.*, **2009**, 19, 241.
- [42] X. Zhang, A. Kovtun, C. Mendoza-Palomares, M. Oulad-Abdelghani, F. Fioretti, S. Rinckenbach, D. Mainard, M. Eppler, N. Benkirane-Jessel, *Biomaterials*, **2010**, 31, 6013.
- [43] V. Sokolova, O. Rotan, J. Klesing, P. Nalbant, J. Buer, T. Knuschke, A. Westendorf, M. Eppler, *J. Nanopart. Res.*, **2012**, 14, 1.
- [44] V. V. Sokolova, I. Radtke, R. Heumann, M. Eppler, *Biomaterials*, **2006**, 27, 3147.
- [45] V. Sokolova, M. Eppler, *Angew. Chem.*, **2008**, 120, 1402.
- [46] M. D. Brown, A. G. Schätzlein, I. F. Uchebu, *Int. J. Pharm.*, **2001**, 229, 1.
- [47] D. Luo, W. M. Saltzman, *Nat. Biotech.*, **2000**, 18, 33.
- [48] E. Wintermantel, S. W. Ha, *Medizintechnik: Life Science Engineering*, Springer, **2009**.

- [49] G. Thews, E. Mutschler, P. Vaupel, *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, **2008**.
- [50] D. Felsenberg, *Pharm. Unserer Zeit*, **2001**, 30, 488.
- [51] R. Gradinger, H. Gollwitzer, *Ossäre Integration*, Springer, **2006**.
- [52] J. M. Rueger, W. Linhard, D. Sommerfeldt, *Orthopäde*, **1998**, 27, 89.
- [53] C. Schiller, *Polyester und Calciumphosphate als resorbierbare Biomaterialien*, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, Bochum, **2003**.
- [54] C. Rentsch, B. Rentsch, D. Scharnweber, H. Zwipp, S. Rammelt, *Unfallchirurg*, **2012**, 115, 938.
- [55] J. M. Rueger, *Orthopäde*, **1998**, 27, 72.
- [56] D. Zaffe, G. Traversa, M. Mozzati, F. Morelli, G. D'Angeli, *J. Appl. Biomater.*, **2011**, 9, 19.
- [57] E. Soldner, G. Herr, *Trauma und Berufskrankheit*, **2001**, 3, 256.
- [58] D. Chen, M. Zhao, G. R. Mundy, *Growth Factors*, **2004**, 22, 233.
- [59] L. You, F. E. Kruse, J. Pohl, H. E. Völcker, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **1999**, 40, 296.
- [60] M. J. Rogers, S. Gordon, H. L. Benford, S. P. Luckman, *Cancer Supplement*, **2000**, 88, 2961.
- [61] V. N. Menshutkin, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1865**, 133, 317.
- [62] H. Fleisch, *Endocr. Rev.*, **1998**, 19, 80.
- [63] R. Bartl, C. Bartl, R. Gradinger, *Der Orthopäde*, **2008**, 37, 595.
- [64] R. G. Russell, M. J. Rogers, *Bone*, **1999**, 25, 97.
- [65] J. R. Ross, Y. Saunders, P. M. Edmonds, S. Patel, D. Wonderling, C. Normand, K. Broadley, *Health Technol. Assess.*, **2004**, 8, 1.
- [66] R. Bartl, E. Von Tresckow, C. Bartl, *Bisphosphonat-Manual*, Springer-Verlag GmbH, **2006**.

- [67] G. K. E. Scriba, *Pharm. Unserer Zeit*, **2000**, 29, 50.
- [68] R. G. G. Russell, *Bone*, **2011**, 49, 2.
- [69] DIN ISO 13321: Partikelgrößenanalyse - Photonenkorrelationsspektroskopie.
- [70] K. Niederauer, W. Schäfer, *Phys. Unserer Zeit*, **1985**, 16, 180.
- [71] P. W. Hawkes, J. C. H. Spence, *Science of Microscopy*, Springer, **2008**.
- [72] D. McMullan, *Scanning*, **1995**, 17, 175.
- [73] B. Beckhoff, B. Kanngier, N. Langhoff, R. Wedell, H. Wolff, *Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis*, Springer, **2007**.
- [74] J. Goldstein, *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, **2003**.
- [75] B. Fultz, J. Howe, *Transmission Electron Microscopy and Diffractometry of Materials*, Springer, **2012**.
- [76] R. Gruehn, R. Roy, *Chem. Unserer Zeit*, **1987**, 21, 194.
- [77] J. Thomas, T. Gemming, *Analytische Transmissionselektronenmikroskopie: Eine Einführung für den Praktiker*, Springer-Verlag KG, **2013**.
- [78] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.*, **1986**, 56, 930.
- [79] Y. H. Song, W. P. Lian, S. C. Zhao, L. Wang, Z. Li, *Microsc. Res. Tech.*, **2010**, 73, 51.
- [80] P. V. Galiy, T. M. Nenchuk, O. R. Dveriy, A. Ciszewski, P. Mazur, S. Zuber, *Physica E Low Dimens. Syst. Nanostruct.*, **2009**, 41, 465.
- [81] T. E. Fisher, A. F. Oberhauser, M. Carrion-Vazquez, P. E. Marszalek, J. M. Fernandez, *Trends Biochem. Sci.*, **1999**, 24, 379.
- [82] D. Fotiadis, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2012**, 23, 510.
- [83] M. Ritzefeld, V. Walhorn, D. Anselmetti, N. Sewald, *Amino Acids*, **2013**, 44, 1457.
- [84] Y. B. Guo, D. G. Wang, S. H. Liu, S. W. Zhang, *Surf. Eng.*, **2013**, 29, 17.

- [85] N. S. Zakaria, S. R. Makhsin, A. Abdul Azlan, K. A. Razak, *Nano Hybrids*, **2013**, 4, 47.
- [86] S. Ramesh, Y. Cohen, D. Aurbach, A. Gedanken, *Chem. Phys. Lett.*, **1998**, 287, 461.
- [87] Q. Tang, S.-Q. Shi, L. Zhou, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2004**, 4, 948.
- [88] W.-K. Lee, M. Yang, A. R. Laracuente, W. P. King, L. J. Whitman, P. E. Sheehan, *Beilstein J. Nanotechnol.*, **2012**, 3, 52.
- [89] E. Bellido, I. Ojea-Jimenez, A. Ghirri, C. Alvino, A. Candini, V. Puntès, M. Affronte, N. Domingo, D. Ruiz-Molina, *Langmuir*, **2012**, 28, 12400.
- [90] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, E. Weibel, *Phys. Rev. Lett.*, **1982**, 49, 57.
- [91] N. Yao, Z. L. Wang, *Handbook of Microscopy for Nanotechnology*, Kluwer Academic Publishers, **2006**.
- [92] *The NanoWizard® AFM Handbook*, JPK Instruments, **2005**.
- [93] E. U. Azeloglu, K. D. Costa, *Methods Mol. Biol.*, **2011**, 736, 303.
- [94] R. Mercade-Prieto, C. R. Thomas, Z. Zhang, *Eur. Biophys. J.*, **2013**, 42, 613.
- [95] D. Hagmeyer, K. Ganesan, J. Ruesing, D. Schunk, C. Mayer, A. Dey, N. A. J. M. Sommerdijk, M. Epple, *J. Mater. Chem.*, **2011**, 21, 9219.
- [96] G. Schwedt, *Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis*, Wiley-VCH Verlag GmbH, **2008**.
- [97] P. W. Atkins, J. de Paula, *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [98] J. Fahrenfort, *Spectrochim. Acta*, **1961**, 17, 698.
- [99] K. Cammann, *Instrumentelle Analytische Chemie: Verfahren, Anwendungen und Qualitätssicherung*, Spektrum Akademischer Verlag, **2001**.
- [100] K. Molt, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **1981**, 308, 321.
- [101] C. B. Faust, *Modern Chemical Techniques: An Essential Reference for Students and Teachers*, Royal Society of Chemistry Education Department, **1997**.
- [102] M. Klessinger, *Chem. Unserer Zeit*, **1978**, 12, 1.

- [103] R. Antoine, P. Dugourd, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, *13*, 16494.
- [104] M. H. Gey, *Instrumentelle Analytik Und Bioanalytik*, Springer, **2008**.
- [105] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, **2007**.
- [106] G. Wedler, H. J. Freund, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, Wiley VCH Verlag GmbH, **2012**.
- [107] W. Massa, *Kristallstrukturbestimmung*, Teubner B.G. GmbH, **2002**.
- [108] U. Holzwarth, N. Gibson, *Nat Nano*, **2011**, *6*, 534.
- [109] A. W. Coats, J. P. Redfern, *Analyst*, **1963**, *88*, 906.
- [110] S. Prakash, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **1962**, *185*, 387.
- [111] S. Materazzi, *Appl. Spectrosc. Rev.*, **1998**, *33*, 189.
- [112] C.-W. Tang, C.-B. Wang, S.-H. Chien, *Thermochim. Acta*, **2008**, *473*, 68.
- [113] E. Pella, B. Colombo, *Microchim. Acta*, **1973**, *61*, 697.
- [114] E. Tschopp, E. Tsehopp, *Helv. Chim. Acta*, **1932**, *15*, 793.
- [115] S. Brunauer, P. H. Emmett, E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.*, **1938**, *60*, 309.
- [116] M. Baerns, A. Behr, A. Brehm, J. Gmehling, H. Hofmann, U. Onken, A. Renken, K. O. Hinrichsen, R. Palkovits, *Technische Chemie*, Wiley VCH Verlag GmbH, **2013**.
- [117] DIN ISO 9277: Bestimmung der spezifischen Oberfläche von Festkörpern mittels Gasadsorption - BET-Verfahren .
- [118] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, **1983**, *65*, 55.
- [119] M. V. Berridge, A. S. Tan, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1993**, *303*, 474.
- [120] P. W. Sylvester, *Methods Mol. Biol.*, **2011**, *716*, 157.
- [121] C. W. Dawson, L. S. Young, *Methods Mol. Biol.*, **2001**, *174*, 165.
- [122] J. A. Plumb, R. Milroy, S. B. Kaye, *Cancer Res.*, **1989**, *49*, 4435.
- [123] J. Brandt, S. Henning, G. Michler, W. Hein, A. Bernstein, M. Schulz, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **2010**, *21*, 283.

- [124] K. L. Gerlach, D. Niehues, *Mund Kiefer GesichtsChir.*, **2007**, 11, 131.
- [125] E. N. Antonov, S. A. Bochkova, A. V. Popova, *Russ. J. Phys. Chem. B*, **2011**, 5, 1253.
- [126] M. Arabmotlagh, U. Sommer, E. Dingeldein, M. Rauschmann, R. Schnettler, *J. Orthop. Res.*, **2012**, 30, 1290.
- [127] N. Bielefeldt, U. Ploska, G. Berger, L. Heimann, *Key Eng. Mat.*, **2009**, 396-398, 469.
- [128] G. Hulsart-Billstroem, Q. Hu, K. Bergman, K. B. Jonsson, J. Aaberg, R. Tang, S. Larsson, J. Hilborn, *Acta Biomater.*, **2011**, 7, 3042.
- [129] G.-M. Kim, *Nanofibers*, InTech, S. 69–88.
- [130] J. Scheel, M. Hermann, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **2011**, 59, 310.
- [131] J. Klesing, S. Chernousova, M. Epple, *J. Mater. Chem.*, **2012**, 22, 199.
- [132] J. Klesing, *Untersuchung zur biologischen Aktivität funktionalisierter Calciumphosphat-Nanopartikel*, Dissertation, Universität Duisburg-Essen, Duisburg, Essen, **2012**.
- [133] J. Schwiertz, W. Meyer-Zaika, L. Ruiz-Gonzalez, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, M. Epple, *J. Mater. Chem.*, **2008**, 18, 3831.
- [134] C.-M. Ho, W.-Y. Yu, C.-M. Che, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2004**, 43, 3303.
- [135] S. Wilhelm, *Wasseraufbereitung: Chemie und Chemische Verfahrenstechnik*, Springer, **2008**.
- [136] *Römpp Enzyklopädie Online*, Thieme, **2013**.
- [137] W. M. Huang, S. J. Gibson, P. Facer, J. Gu, J. M. Polak, *Histochemistry*, **1983**, 77, 275.
- [138] F. B. Oppermann-Sanio, A. Steinbuechel, *Naturwissenschaften*, **2002**, 89, 11.
- [139] G. Minigo, A. Scholzen, C. K. Tang, J. C. Hanley, M. Kalkanidis, G. A. Pietersz, V. Apostolopoulos, M. Plebanski, *Vaccine*, **2007**, 25, 1316.

- [140] S. Choksakulnimitr, S. Masuda, H. Tokuda, Y. Takakura, M. Hashida, *J. Controlled Release*, **1995**, 34, 233.
- [141] D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, T. Kissel, *Biomaterials*, **2003**, 24, 1121.
- [142] Y. Wen, S. Pan, X. Luo, X. Zhang, W. Zhang, M. Feng, *Bioconjug. Chem.*, **2009**, 20, 322.
- [143] L. Marsich, A. Bonifacio, S. Mandal, S. Krol, C. Beleites, V. Sergo, *Langmuir*, **2012**, 28, 13166.
- [144] Z. Cao, L. Yang, Y. Yan, Y. Shang, Q. Ye, D. Qi, U. Ziener, G. Shan, K. Landfester, *J. Colloid Interface Sci.*, **2013**, 406, 139.
- [145] Y. Chen, Q. Wang, T. Wang, *Dalton Trans.*, **2013**, 42, 13940.
- [146] S. Shi, M. Wang, C. Chen, J. Gao, H. Ma, J. Ma, J. Xu, *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 9591.
- [147] X. Yang, N. Zhao, Q. Zhou, C. Cai, X. Zhang, J. Xu, *J. Mater. Chem. C*, **2013**, 1, 3359.
- [148] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.*, **1968**, 26, 62.
- [149] S. R. Hall, S. A. Davis, S. Mann, *Langmuir*, **2000**, 16, 1454.
- [150] Y. Kobayashi, H. Kakinuma, D. Nagao, Y. Ando, T. Miyazaki, M. Konno, *J. Nanopart. Res.*, **2009**, 11, 1787.
- [151] P. Caregnato, M. L. Dell’Arciprete, M. C. Gonzalez, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2013**, 12, 1658.
- [152] K. L. Lusker, J.-R. Li, J. C. Garno, *Langmuir*, **2011**, 27, 13269.
- [153] S. Taira, S. Moritake, T. Hatanaka, Y. Ichiyanagi, M. Setou, *Methods Mol. Biol.*, **2009**, 544, 571.
- [154] D. Giaume, M. Poggi, D. Casanova, G. Mialon, K. Lahlil, A. Alexandrou, T. Gacoin, J.-P. Boilot, *Langmuir*, **2008**, 24, 11018.
- [155] B. Feng, R. Y. Hong, L. S. Wang, L. Guo, H. Z. Li, J. Ding, Y. Zheng, D. G. Wei, *Colloids Surf., A*, **2008**, 328, 52.

- [156] M. Yamaura, R. L. Camilo, L. C. Sampaio, M. A. MacÃ^ado, M. Nakamura, H. E. Toma, *J. Magn. Magn. Mater.*, **2004**, 279, 210.
- [157] J. A. Howarter, J. P. Youngblood, *Langmuir*, **2006**, 22, 11142.
- [158] D. Kozlova, S. Chernousova, T. Knuschke, J. Buer, A. Westendorf, M. Epple, *J. Mater. Chem.*, **2012**, 22, 396.
- [159] M. K. Rahulan, G. Vinitha, S. Ganesan, R. Philip, P. Aruna, *J. Mater. Sci.: Mater. Electron.*, **2012**, 23, 877.
- [160] Y. J. Wong, L. Zhu, W. S. Teo, Y. W. Tan, Y. Yang, C. Wang, H. Chen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 11422.
- [161] M. Mashimo, Q. Ji, S. Ishihara, H. Sakai, M. Abe, J. P. Hill, K. Ariga, *Chem. Lett.*, **2011**, 40, 840.
- [162] J. S. DuChene, R. P. Almeida, W. D. Wei, *Dalton Trans.*, **2012**, 41, 7879.
- [163] Q. Dai, M. Lam, S. Swanson, R.-H. R. Yu, D. J. Milliron, T. Topuria, P.-O. Jubert, A. Nelson, *Langmuir*, **2010**, 26, 17546.
- [164] X.-D. Tian, B.-J. Liu, J.-F. Li, Z.-L. Yang, B. Ren, Z.-Q. Tian, *J. Raman Spectrosc.*, **2013**, 44, 994.
- [165] P. Suktha, K. Lekpet, P. Siwayaprahm, M. Sawangphruk, *J. Appl. Polym. Sci.*, **2013**, 128, 4339.
- [166] D. V. Quy, M. H. Nguyen, P. T. Tra, H. N. Nguyen, H. H. Nguyen, T. S. Nguyen, P. T. Nghia, T. V. A. Nguyen, T. T. Hong, H. L. Nguyen, *J. Nano Mat.*, **2013**, 603940, 7 pp.
- [167] M. S. Moorthy, D.-J. Seo, H.-J. Song, S. S. Park, C.-S. Ha, *J. Mater. Chem. A*, **2013**, 1, 12485.
- [168] M. Zhang, K. Fang, M. Lin, B. Hou, L. Zhong, Y. Zhu, W. Wei, Y. Sun, *J. Phys. Chem. C*, **2013**, 117, 21529.
- [169] M. Neumeier, L. A. Hails, S. A. Davis, S. Mann, M. Epple, *J. Mater. Chem.*, **2011**, 21, 1250.
- [170] U. Schmidt, E. K. W. Schulte, Wiley-VCH, **2000**.

- [171] V. Sabaliauskiene, A. Sasnauskiene, J. Kadziauskas, V. Kirveliėne, *Biologija*, **2008**, 54, 174.
- [172] A. Sasnauskiene, J. Kadziauskas, N. Vėzelyte, V. Jonusiene, V. Kirveliėne, *Autophagy*, **2009**, 5, 743.
- [173] A. Peetsch, *Synthese und Funktionalisierung anorganischer Nanopartikel zur Wechselwirkung mit Bakterien und Zellen*, Dissertation, Universität Duisburg-Essen, Duisburg, Essen, **2013**.
- [174] M. M. Mady, W. A. Mohammed, N. M. El-Guendy, A. A. Elsayed, *Romanian. J. Biophys.*, **2011**, 21, 151.
- [175] T. W. J. Steele, X. Zhao, P. Tarcha, T. Kissel, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2012**, 80, 14.
- [176] M. Oba, *Biol. Pharm. Bull.*, **2013**, 36, 1045.
- [177] C. H. Jones, C.-K. Chen, A. Ravikrishnan, S. Rane, B. A. Pfeifer, *Mol. Pharm.*, **2013**, 10, 4082.
- [178] M. Zheng, T. Kissel, S. Agarwa, *LaborPraxis*, **2011**, 35, 28.
- [179] P. Midoux, C. Pichon, J.-J. Yaouanc, P.-A. Jaffrės, *Br. J. Pharmacol.*, **2009**, 157, 166.
- [180] M. A. Wolfert, L. W. Seymour, *Gene Ther.*, **1996**, 3, 269.
- [181] S. Kawakami, Y. Ito, P. Charoensit, F. Yamashita, M. Hashida, *J. Pharm. Exp. Ther.*, **2006**, 317, 1382.
- [182] N. Salehi, C.-A. Peng, *J. Microbiol. Methods*, **2012**, 91, 133.
- [183] J. Han, S. K. Kim, T.-S. Cho, J.-C. Lee, H. S. Joung, *Macromol. Res.*, **2004**, 12, 501.
- [184] J. Zhang, Y. Lei, A. Dhaliwal, Q. K. T. Ng, J. Du, M. Yan, Y. Lu, T. Segura, *Biomacromolecules*, **2011**, 12, 1006.
- [185] M. Mller, *Advances in Polymer Science*, Band 256, Springer, **2014**, S. 197–260.
- [186] W. Fischer, M. Calderon, A. Schulz, I. Andreou, M. Weber, R. Haag, *Bioconjug. Chem.*, **2010**, 21, 1744.

- [187] W. T. Godbey, K. K. Wu, A. G. Mikos, *J. Controlled Release*, **1999**, *60*, 149.
- [188] H. Petersen, P. M. Fechner, A. L. Martin, K. Kunath, S. Stolnik, C. J. Roberts, D. Fischer, M. C. Davies, T. Kissel, *Bioconjug. Chem.*, **2002**, *13*, 845.
- [189] D. Freifelder, P. F. Davison, *Biophys. J.*, **1962**, *2*, 235.
- [190] S. W. Keller, H.-N. Kim, T. E. Mallouk, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 8817.
- [191] Y. Lvov, F. Essler, G. Decher, *J. Phys. Chem.*, **1993**, *97*, 13773.
- [192] R. K. Iler, *J. Colloid Interface Sci.*, **1966**, *21*, 569.
- [193] G. Decher, *Science*, **1997**, *277*, 1232.
- [194] C. S. Peyratout, L. Daehne, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2004**, *43*, 3762.
- [195] C. Gao, S. Leporatti, S. Moya, E. Donath, H. Moehwald, *Langmuir*, **2001**, *17*, 3491.
- [196] A. Fery, B. Schoeler, T. Cassagneau, F. Caruso, *Langmuir*, **2001**, *17*, 3779.
- [197] X. Qiu, E. Donath, H. Mohwald, *Macromol. Mater. Eng.*, **2001**, *286*, 591.
- [198] G. Berth, A. Voigt, H. Dautzenberg, E. Donath, H. Moehwald, *Biomacromolecules*, **2002**, *3*, 579.
- [199] A. Prokop, D. Hunkeler, A. C. Powers, R. R. Whitesell, *Adv. Polym. Sci.*, **1998**, *136*, 53.
- [200] B. G. De Geest, S. De Koker, G. B. Sukhorukov, O. Kreft, W. J. Parak, A. G. Skirtach, J. Demeester, S. C. De Smedt, W. E. Hennink, *Soft Matter*, **2009**, *5*, 282.
- [201] G. B. Sukhorukov, E. Donath, S. Davis, H. Lichtenfeld, F. Caruso, V. I. Popov, H. Mohwald, *Polym. Adv. Technol.*, **1998**, *9*, 759.
- [202] B. G. De Geest, G. B. Sukhorukov, H. Mohwald, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2009**, *6*, 613.
- [203] B. G. De Geest, R. E. Vandenbroucke, A. M. Guenther, G. B. Sukhorukov, W. E. Hennink, N. N. Sanders, J. Demeester, S. C. De Smedt, *Adv. Mater.*, **2006**, *18*, 1005.
- [204] A. M. Schwartzberg, T. Y. Oshiro, J. Z. Zhang, T. Huser, C. E. Talley, *Anal. Chem.*, **2006**, *78*, 4732.

- [205] S. N. Abdollahi, M. Naderi, G. Amoabediny, *Colloids Surf., A*, **2013**, 436, 1069.
- [206] L. Guo, I. Panderi, D. D. Yan, K. Szulak, Y. Li, Y.-T. Chen, H. Ma, D. B. Niesen, N. Seeram, A. Ahmed, B. Yan, D. Pantazatos, W. Lu, *ACS Nano*, **2013**, 7, 8780.
- [207] P. R. Selvakannan, M. Sastry, *Chem. Commun.*, **2005**, 1684.
- [208] Z. Yan, R. Bao, D. B. Chrisey, *Nanotechnology*, **2010**, 21, 145609/1.
- [209] N. Kawahashi, H. Shiho, *J. Mater. Chem.*, **2000**, 10, 2294.
- [210] X. Ren, D. Chen, F. Tang, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109, 15803.
- [211] Z. Chen, P. Zhan, Z. Wang, J. Zhang, W. Zhang, N. Ming, C. Chan, P. Sheng, *Adv. Mater.*, **2004**, 16, 417.
- [212] D. Zhang, L. Qi, J. Ma, H. Cheng, *Adv. Mater.*, **2002**, 14, 1499.
- [213] Z. Wang, M. Chen, L. Wu, *Chem. Mater.*, **2008**, 20, 3251.
- [214] H. J. Hah, J. S. Kim, B. J. Jeon, S. M. Koo, Y. E. Lee, *Chem. Commun.*, **2003**, 1712.
- [215] H.-P. Hentze, S. R. Raghavan, C. A. McKelvey, E. W. Kaler, *Langmuir*, **2003**, 19, 1069.
- [216] J.-F. Chen, H.-M. Ding, J.-X. Wang, L. Shao, *Biomaterials*, **2004**, 25, 723.
- [217] S.-D. Jiang, Q.-Z. Yao, G.-T. Zhou, S.-Q. Fu, *J. Phys. Chem. C*, **2012**, 116, 4484.
- [218] W. Tjandra, P. Ravi, J. Yao, K. C. Tam, *Nanotechnology*, **2006**, 17, 5988.
- [219] Y. Cai, H. Pan, X. Xu, Q. Hu, L. Li, R. Tang, *Chem. Mater.*, **2007**, 19, 3081.
- [220] S. Hyuk Im, U. Jeong, Y. Xia, *Nat. Mater.*, **2005**, 4, 671.
- [221] C. J. McDonald, M. J. Devon, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2002**, 99, 181.
- [222] Y. Hu, X. Jiang, Y. Ding, Q. Chen, C. Z. Yang, *Adv. Mater.*, **2004**, 16, 933.
- [223] X. W. Lou, L. A. Archer, Z. C. Yang, *Adv. Mater.*, **2008**, 20, 3987.
- [224] L. Dähne, *Angew. Chem.*, **2009**, 121, 4169.

- [225] O. I. Vinogradova, O. V. Lebedeva, K. Vasilev, H. Gong, J. Garcia-Turiel, B.-S. Kim, *Biomacromolecules*, **2005**, 6, 1495.
- [226] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2. Auflage, Academic Press, **2008**.
- [227] C. Boga, S. Puggioli, M. Gherpelli, G. Farruggia, E. Pagnotta, L. Masotti, P. Neyroz, *Anal. Biochem.*, **2004**, 335, 196.
- [228] J. Tripathy, A. M. Raichur, *Colloids Surf., B*, **2013**, 101, 487.
- [229] V. Strehlow, J. Lessig, M. Goese, U. Reibetanz, *J. Mater. Chem. B*, **2013**, 1, 3633.
- [230] C. G. Oster, N. Kim, L. Grode, L. Barbu-Tudoran, A. K. Schaper, S. H. E. Kaufmann, T. Kissel, *J. Controlled Release*, **2005**, 104, 359.
- [231] K. Fu, D. W. Pack, A. M. Klibanov, R. Langer, *Pharm. Res.*, **2000**, 17, 100.
- [232] C. Wang, Q. Ge, D. Ting, D. Nguyen, H.-R. Shen, J. Chen, H. N. Eisen, J. Heller, R. Langer, D. Putnam, *Nat. Mater.*, **2004**, 3, 190.
- [233] J. L. Santos, A. Nouri, T. Fernandes, J. Rodrigues, H. Tomás, *Biotechnol. Prog.*, **2012**, 28, 1088.
- [234] P. Li, N. Zhang, *Curr. Gene Ther.*, **2011**, 11, 58.
- [235] C. Schueler, F. Caruso, *Biomacromolecules*, **2001**, 2, 921.
- [236] A. N. Zelikin, A. L. Becker, A. P. R. Johnston, K. L. Wark, F. Turatti, F. Caruso, *ACS Nano*, **2007**, 1, 63.
- [237] Arnida, A. Malugin, H. Ghandehari, *J. Appl. Toxicol.*, **2010**, 30, 212.
- [238] K. Niikura, T. Matsunaga, T. Suzuki, S. Kobayashi, H. Yamaguchi, Y. Orba, A. Kawaguchi, H. Hasegawa, K. Kajino, T. Ninomiya, K. Ijio, H. Sawa, *ACS Nano*, **2013**, 7, 3926.
- [239] A. Albanese, P. S. Tang, W. C. W. Chan, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **2012**, 14, 1.
- [240] J. Wang, H.-Q. Mao, K. W. Leong, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 9480.
- [241] V. Sanz, H. M. Coley, S. R. P. Silva, J. McFadden, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2012**, 12, 1739.

- [242] G. P. Vlasov, E. A. Lesina, V. I. Korol'kov, I. A. Gur'yanov, N. V. Bayanova, A. N. Baranov, A. V. Kiselev, V. S. Baranov, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **2005**, *31*, 153.
- [243] J. A. Meganck, D. L. Begun, J. D. McElderry, A. Swick, K. M. Kozloff, S. A. Goldstein, M. D. Morris, J. C. Marini, M. S. Caird, *Bone*, **2013**, *56*, 204.
- [244] S. Panzavolta, P. Torricelli, B. Bracci, M. Fini, A. Bigi, *J. Inorg. Biochem.*, **2010**, *104*, 1099.
- [245] A. C. V. Canettieri, C. E. D. Colombo, C. M. Chin, H. Faig-Leite, *Int. J. Exp. Pathol.*, **2009**, *90*, 520.
- [246] T. Tanaka, M. Saito, M. Chazono, Y. Kumagae, T. Kikuchi, S. Kitasato, K. Marumo, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **2010**, *93A*, 469.
- [247] E. W. H. Bodde, R. S. Z. Kowalski, P. H. M. Spauwen, J. A. Jansen, *Tissue Eng. A*, **2008**, *14*, 29.
- [248] C. P. Peter, W. O. Cook, D. M. Nunamaker, M. T. Provost, J. G. Seedor, G. A. Rodan, *J. Orthop. Res.*, **1996**, *14*, 74.
- [249] K. Nishitani, T. Shirai, M. Kobayashi, H. Kuroki, Y. Azuma, Y. Nakagawa, T. Nakamura, *Am. J. Sports Med.*, **2009**, *37 Suppl 1*, 139S.
- [250] H. Toker, H. Ozdemir, H. Ozer, K. Eren, *Arch. Oral Biol.*, **2012**, *57*, 1545.
- [251] V. Sokolova, O. Prymak, W. Meyer-Zaika, H. Cölfen, H. Rehage, A. Shukla, M. Epple, *Materwiss. Werksttech.*, **2006**, *37*, 441.
- [252] A. Kovtun, D. Kozlova, K. Ganesan, C. Biewald, N. Seipold, P. Gaengler, W. H. Arnold, M. Epple, *RSC Adv.*, **2012**, *2*, 870.
- [253] A. Peetsch, C. Greulich, D. Braun, C. Stroetges, H. Rehage, B. Siebers, M. Köller, M. Epple, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2013**, *102*, 724.
- [254] J. Sun, F. Song, W. Zhang, B. E. Sexton, L. J. Windsor, *Arch. Oral Biol.*, **2012**, *57*, 728.
- [255] A. Enjuanes, S. Ruiz-Gaspá, P. Peris, D. Ozalla, L. Álvarez, A. Combalia, M. Martínez de Osaba, A. Monegal, A. Pares, N. Guanabens, *Endocrine*, **2010**, *37*, 180.
- [256] Y. Xiong, H. J. Yang, J. Feng, Z. L. Shi, L. D. Wu, *J. Int. Med. Res.*, **2009**, *37*, 407.

- [257] S. Chernousova, J. Klesing, N. Soklakova, M. Epple, *RSC Advances*, **2013**, 3, 11155.
- [258] W. Götz, C. Reichert, L. Canullo, A. Jüger, F. Heinemann, *Ann. Anat.*, **2012**, 194, 171.
- [259] S. Ylae-Herttuala, T. T. Rissanen, I. Vajanto, J. Hartikainen, *Journal of the American College of Cardiology*, **2007**, 49, 1015.
- [260] M. L. Hallensleben, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, **2000**.
- [261] H. U. Schenck, P. Simak, E. Haedicke, *J. Pharm. Sci.*, **1979**, 68, 1505.
- [262] J. L. Zamora, *Am. J. Surg.*, **1986**, 151, 400.
- [263] F. Fischer, S. Bauer, *Chem. Unserer Zeit*, **2009**, 43, 376.
- [264] M. Tejamaya, I. Römer, R. C. Merrifield, J. R. Lead, *Environ. Sci. Technol.*, **2012**, 46, 7011.
- [265] S. Kittler, C. Greulich, M. Köller, M. Epple, *Materwiss Werksttech*, **2009**, 40, 258.
- [266] D. Mahl, J. Diendorf, S. Ristig, C. Greulich, Z.-A. Li, M. Farle, M. Köller, M. Epple, *J. Nanopart. Res*, **2012**, 14, 1.
- [267] S. C. Shukla, A. Singh, A. K. Pandey, A. Mishra, *Biochem. Eng. J.*, **2012**, 65, 70.
- [268] I.-L. Shih, M.-H. Shen, Y.-T. Van, *Bioresour. Technol.*, **2004**, 97, 114811.
- [269] H. Urch, M. Vallet-Regi, L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Epple, *J. Mater. Chem.*, **2009**, 19, 2166.

8 Anhang

Liste der verwendeten Abkürzungen

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
bp	Basenpaar
CaP	Calciumphosphat
CaP/CMC	CMC-stabilisiertes Calciumphosphat
CaP/PAH	PAH-stabilisiertes Calciumphosphat
CaP/PAH/DNA	PAH-stabilisiertes Calciumphosphat mit DNA
CaP/PAH/DNA	PAH-stabilisiertes Calciumphosphat mit DNA und PAH
CMC	Carboxymethylcellulose
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
EA	Elementaranalyse
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FCS	fetales Kälberserum
HeLa	Henrietta Lacks
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
ICDD	International Centre for Diffraction Data
kDa	Kilodalton
MG-63	Humane Osteoblasten-ähnliche Zelllinie
mRNA	messenger RNA
MES	N-Morpholinoethansulfonsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
M_w	mittlere Molmasse (Gewichtsmittel)

Liste der verwendeten Abkürzungen

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDI	Polydispersitätsindex
PAH	Polyallylaminhydrochlorid
PAH-DNA-PAH	Kapseln aus zwei Schichten PAH und einer Schicht DNA
PDADMAC	Polydiallyldimethylammoniumchlorid
PEI	Polyethylenimin
PLL	Poly-L-Lysin
PSS	Polystyrolsulfonat
PVP	Polyvinylpyrrolidon
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	ribonucleic acid
siRNA	small interfering RNA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEOS	Tetraethoxysilan
TG	Thermogravimterie
SF	Safranin
UV	Ultraviolett
Vis	Visible
XRD	Röntgenpulverdiffraktometrie

Liste der verwendeten Chemikalien

Name	Hersteller	Bemerkung
Ammoniaklösung	Carl Roth	30 %
α -Polylysin	Sigma	15 kDa
Calcium L-lactat Pentahydrat	Fluka	p.a.
Carboxymethylcellulose (Natriumsalz)	Aldrich	90 kDa
Chitosan	Aldrich	200 kDa
di-Ammoniumhydrogenphosphat	Sigma	p.a.
DMSO	sds	
DNA	Sigma	aus Lachshoden
DNA	Sigma	aus Heringssperma
DNA	Macherey-Nagel	pcDNA3-EGFP
ϵ -Polylysin	Carbosynth	3,5 kDa
Ethanol	VWR	99,8 %
Fluoresceinisothiocyanat	Calbiochem	95 %
HOBt Hydrat	Fluka	≥ 99 %
MES	Sigma	≥ 99 %
Ostim	aap	6 %-ige Dispersion
Poly(diallyldimethylammoniumchlorid)		
Lösung in Wasser (20 %)	Aldrich	100 kDa
Polyallylaminhydrochlorid	Aldrich	15 kDa
Polyallylaminhydrochlorid	Aldrich	56 kDa
Polyallylaminhydrochlorid-FITC	Aldrich	15 kDa
Polyethylenimin	Aldrich	750 kDa
Polyethylenimin Lösung in Wasser	Aldrich	2 kDa
Polyethylenimin verzweigt	Aldrich	25 kDa
Polyvinylpyrrolidon	Fluka	40 kDa
Safranin	Fluka	95 %
Salzsäure	AVS	1 mol L ⁻¹
siRNA	Invitrogen	(anti-EGFP)

Liste der verwendeten Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Bemerkung
Dynamische Lichtstreuung	Malvern Instruments	Zetasizer Nano ZS
Energiedispersive Röntgenspektroskopie	EDAX	Genesis 4000
Micro-Plate Reader	Dynex Technologies	MRX Revelation
Mikroskop	Zeiss	Axiovert 40 CFL
	Keyence	Keyence-Mikroskop BZ 9000
	Zeiss	LSM 700
Pulverdiffraktometer	Bruker	D8 Advance
Rasterelektronenmikroskop	FEI	Quanta 400 FEG
Transmissionselektronenmikroskop	Philips	CM 200 FEG
Thermowaage	Netzsch	TG 449 F3 Jupiter [©]
Ultraschalldisperser UP50H	Hielscher	Sonotrode 2, Amplitude 50 %, Puls 0,8
UV/Vis-Spektrometer	Varian	Cary Bio 300
IR-Spektrometer	Bruker	Vertex 70
IR-Spektrometer	Bruker	ALPHA-Platinum FT-IR-Spektrometer mit ATR- Probenmodul
Fluoreszenzspektrometer	Agilent	cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer
Rasterkraftmikroskop	JPF	NanoWizard
Peristaltikpumpe	ISMATEC	Reglo Analog MS-2/6

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Publikationsliste

A) Reguläre Publikationen in referierten wissenschaftlichen Fachzeitschriften

- D. Hagmeyer, K. Ganesan, J. Ruesing, D. Schunk, C. Mayer, A. Dey, N.A.J.M. Sommerdijk, M. Epple, „Self-assembly of calcium phosphate nanoparticles into hollow spheres induced by dissolved amino acids“, **Journal of Materials Chemistry** **21** (2011) 9219-9223.
- D. Hagmeyer, J. Ruesing, T. Fenske, H.W. Klein, C. Schmuck, W. Schrader, M.E.M. da Piedade, M. Epple, „Direct experimental observation of the aggregation of amino acids into 100-200 nm clusters in aqueous solution“, **RSC Advances** **2** (2012) 4690-4696.
- L. Kordelas, V. Rebmann, A.K. Ludwig, S. Radtke, J. Ruesing, T.R. Döppner, M. Epple, P.A. Horn, D. Beelen, B. Giebel, „Treatment of severe acute graft-versus-host disease with mesenchymal stem cell-derived exosomes“, **Leukemia** (2014) 970-973.

B) Sonstige Publikationen, Kurzbeiträge, zitierfähige Konferenzabstracts

- D. Hagmeyer, J. Ruesing, M. Epple, „Die Selbstorganisation von Calciumphosphat-Nanopartikeln zu Hohlstrukturen in Gegenwart von Aminosäuren“, **Biomaterialien** **11** (2010) 173.
- J. Ruesing, V. Sokolova, A.K. Ludwig, S. Hornung, O. Rotan, P.A. Horn, B. Giebel, M. Epple, „Charakterisierung von Exosomen mittels Rasterelektronenmikroskopie und Nanoparticle Tracking Analysis“, **Biomaterialien** **12** (2011) 146.
- K. Sivalingam, J. Ruesing, C. Greulich, M. Epple, T. Schildhauer, and M. Köller, „Studies on the influence of silver ion-doped calcium phosphate nanoparticles on human mesenchymal stem cells within a plasma clot matrix“, **BioNanoMaterials** **14** (2013) 105.

C) Wissenschaftliche Vorträge (P=Poster, V=Vortrag)

- Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology, Berezove, Crimea, Ukraine, 06.-10.09.2010, J. Ruesing, D. Hagmeyer, M. Eppe, „The formation of calcium phosphate hollow spheres is induced by phosphorylated amino acids“ (P)
- Symposium „Molecular Bionics - From biomineralization to functional materials“, Ringberg, 03.-06.10.2010, M. Eppe, J. Ruesing, D. Hagmeyer, „Hollow spheres of calcium phosphate - indication for a supramolecular organization of amino acids“ (P)
- Symposium „Molecular Bionics - From biomineralization to functional materials“, Ringberg, 03.-06.10.2010, M. Eppe, J. Ruesing, D. Hagmeyer, „Hollow spheres of calcium phosphate - indication for a supramolecular organization of amino acids“ (V, invited)
- IRUN Symposium on Nanotechnology, Barcelona, 14.-15.10.2010, D. Hagmeyer, J. Ruesing, D. Schunk, C. Mayer, A. Dey, N.A.J.M. Sommerdijk, M. Eppe, „Self-assembly of calcium phosphate nanoparticles into hollow spheres in the presence of amino acids and dipeptides“ (V)
- Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Heilbad Heiligenstadt, 18.-20.11.2010, D. Hagmeyer, J. Ruesing, M. Eppe, „Die Selbstorganisation von Calciumphosphat-Nanopartikeln zu Hohlstrukturen in Gegenwart von Aminosäuren“ (P)
- Symposium on Supramolecular Chemistry, Essen, 24.-25.02.2011, D. Hagmeyer, J. Ruesing, M. Eppe, „The self-assembly of calcium phosphate hollow spheres as an indication for the supramolecular assembly of amino acids“ (P)
- Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Gießen, 10.-12.11.2011, J. Ruesing, V. Sokolova, A.K. Ludwig, S. Hornung, O. Rotan, P.A. Horn, B. Giebel, M. Eppe, „Charakterisierung von Exosomen mittels Rasterelektronenmikroskopie und Nanoparticle Tracking Analysis“ (V)
- 2012 International Society for Extracellular Vesicles Annual Scientific Meeting, Gothenburg, Sweden 18.-21.04.2012, A.K. Ludwig, V. Sokolova, T.R. Doeppner, S. Durst, S. Hornung, J. Ruesing, M. Eppe, P.A. Horn, B. Giebel, „Characterization of human cell derived exosomes by nanoparticle tracking analysis“ (P)

- World Biomaterials Congress, Chengdu, China, 01.-05.06.2012, J. Ruesing, V. Sokolova, A.K. Ludwig, P.A. Horn, B. Giebel, M. Epple, „Characterisation of Exosomes by Nanoparticle Tracking Analysis“ (**P**)
- Russian-German Workshop „Biocompatible Materials and Coatings: Fundamental Problems & Trends, Biomedical Applications“ (BMC-2013), Tomsk, 24.-27.02.2013, J. Ruesing, M. Epple, „Calcium phosphate nanoparticles for drug delivery“ (**V**)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„ Calciumphosphat-Nanopartikel als Wirkstoffträger:
Kolloidchemie und biomedizinische Anwendung“**

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet zu haben.

Zudem erkläre ich, dass ich die Arbeit in dieser oder einer ähnlichen Form bei keiner anderen Fakultät eingereicht und bisher an keinem Promotionsverfahren teilgenommen habe.

Essen, 11.04.2014

Unterschrift

Danksagung

Ich danke...

Herrn Prof. Dr. Epple für die Überlassung der Themen, die sehr gute Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft, die diese Arbeit möglich gemacht haben, sowie die Freiräume, die mir gelassen wurden.

Herrn Prof. Dr. Mayer für die Übernahme des Zweitgutachtens,

Herrn M. Sc. Groß-Heitfeld für die Anfertigung der rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen,

Frau M. Sc. Kozlova, Frau M. Sc. Rotan und Frau M. Sc. Chernousova und Frau Peter für die biologischen Arbeiten,

Frau M. Sc. Loza und Herrn Dipl. Ing. Boukercha für die Rasterelektronenmikroskopie,

Frau Brauner und Frau Hiltenkamp für die Ergebnisse der Elementaranalytik,

Frau M. Sc. Gaer für die Anfertigung der BET-Messungen,

Herrn Dr. med. Schlickewei und seinen Kollegen vom Universitätsklinikum Eppendorf für die gute Kooperation,

Herrn Dr. Meyer-Zaika für die Anfertigung von TEM-Aufnahmen,

Frau Wenzel und Herrn Unterschemmann für die Unterstützung im Labor

Herrn Dipl. Chem. (FH) Enax, Herrn M. Sc. Dördelmann, Herrn Dipl. Chem. Backhaus,

Frau Dipl. Chem. Petrack und Herrn StD Rüsing für die kritische Durchsicht der Arbeit, allen Mitarbeitern für die Diskussionsbereitschaft und Unterstützung,

Anja für ihre Geduld,

meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung.